



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Análisis de los mecanismos de expresión de genes que codifican subunidades de la citocromo c oxidasa de plantas”

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AUTOR: Lic. Eduardo Federico Mufarrege

DIRECTOR: Dr. Daniel Héctor Gonzalez

CO-DIRECTORA: Dra. Graciela Cristina Curi

LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

INSTITUTO DE AGROBIOTECNOLOGÍA DEL LITORAL

- 2011-

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	XIII
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 La mitocondria	1
1.1.1 Funciones de la mitocondria	2
1.2 Mitocondrias de plantas	4
1.2.1 Funciones de las mitocondrias de plantas	4
1.2.2 Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa	6
1.2.3 Genoma mitocondrial de plantas	10
1.2.4 Migración de genes mitocondriales al núcleo e interacción entre ambos genomas	11
1.2.5 Complejo IV: Citocromo c oxidasa	15
1.2.5.1 Funciones del complejo citocromo c oxidasa	15
1.2.5.2 Estructura y biogénesis del complejo citocromo c oxidasa	16
1.2.5.2.1 Subunidades codificadas en el genoma mitocondrial	16
1.2.5.2.2 Subunidades codificadas en el genoma nuclear	20
1.2.5.2.3 Subunidades de COX codificadas en el genoma nuclear de plantas	25
1.2.5.3.1 Las subunidades COX6	27
1.2.5.3.2 Los genes de la subunidad COX5c son regulados por un intrón ubicado en la región 5'UTR	29
1.2. La expresión génica mediada por intrones (IME)	29

2.1 Algunos antecedentes de la expresión génica mediada por intrones	29
2.2 Mecanismos involucrados en el incremento de la expresión génica mediada por intrones	29
2.3 El complejo de la unión entre exones (EJC)	35
2.3.1 Estructura del EJC	36
2.3.1.1 Las proteínas del núcleo del EJC	37
2.3.1.1.1 La proteína MLN51	37
2.3.1.1.2 La proteína eIF4A-III	38
2.3.1.1.3 La proteína Mago	38
2.3.1.1.3 La proteína Y14	39
2.3.2 Proteínas accesorias y funciones asociadas al EJC	39
2.3.2.1 Relación del EJC con la vía de vigilancia y degradación de ARNm (NMD)	43
2.3.3 El desensamblaje del EJC del ARNm.	
 Posible función de la proteína Pym	45
 2.3.4 El EJC de plantas	47
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.1. Material utilizado	52
3.1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
3.1.1.1. Condiciones generales de crecimiento en cámara de cultivo	52

3.1.1.2. Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizadas para la infiltración con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	53
3.1.1.3. Plantas transformantes de <i>Arabidopsis</i>	53
3.1.2. Cepas utilizadas	54
3.1.3. Vectores utilizados	55
3.1.3.1. Vectores para el clonado de fragmentos de ADN	55
3.1.3.2. Vectores para la expresión de proteínas recombinantes en bacterias	55
3.2 Metodología empleada	56
3.2.1. Métodos de clonado	56
3.2.1.1. Aislamiento y clonado de las regiones promotoras de interés de <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
3.2.1.1.1 Clonado de la región promotora del gen <i>AtCOX6a</i> (At4g37830)	56
3.2.1.1.2 Clonado de la región promotora del gen <i>AtCOX6b-1</i> (At1g22450)	57
3.2.1.1.3 Clonado de la región promotora del gen <i>AtCOX6b-2</i> (At5g57815)	58
3.2.1.1.4 Clonado de la región promotora del gen <i>AtCOX6b-3</i> (At4g28060)	59
3.2.1.1.5 Clonado de la región promotora del gen <i>AtMAGO</i> (At1g02140)	59
3.2.1.1.6 Clonado de la región promotora del gen <i>AtY14</i> (At1g51510)	59
3.2.1.1.7 Clonado de la región promotora del gen <i>AtPYM</i> (At1g11400)	60
3.2.1.2. Sobreexpresión de los genes <i>AtMAGO</i> , <i>AtY14</i> y <i>AtPYM</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
3.2.2. Amplificación por PCR de fragmentos de ADN (reacción en cadena de la polimerasa)	61
3.2.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción	62

3.2.4. Ligación de moléculas de ADN	62
3.2.5. Transformación de bacterias	62
3.2.5.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> con ADN plasmídico por electroporación	62
3.2.5.2. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con ADN plasmídico	63
3.2.5.2.1. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a través de choque térmico	63
3.2.5.2.2. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a través de electroporación	64
3.2.6. Preparación de ácidos nucleicos	65
3.2.6.1. Minipreparación de ADN plasmídico	65
3.2.6.2. Minipreparación de ADN de <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
3.2.6.3. Extracción y purificación de ARN de <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
3.2.6.3.1. Metodología empleando LiCl	66
3.2.6.3.2. Metodología empleando el reactivo Trizol	67
3.2.7. Análisis de ácidos nucleicos	68
3.2.7.1. Cuantificación de ácidos nucleicos	68
3.2.7.2. Determinación de la secuencia de los fragmentos de ADN clonados	68
3.2.7.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	69
3.2.7.4. Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes	70
3.2.7.5. Técnica de northern blot	71
3.2.7.6 Transcripción reversa	71
3.2.7.7 Hibridización de membranas de nylon	72
3.2.7.8. Marcación de sondas de ADN	72

3.2.7.8.1. Purificación de fragmentos de ADN	72
3.2.7.8.2. Marcado radioactivo de los fragmentos de ADN	72
3.2.7.9. Marcación radioactiva de fragmentos de ADN para ensayos de retardo en gel	73
3.2.7.10. Elución y purificación de fragmentos de ADN de geles de poliacrilamida	74
3.2.8. Proteínas	75
3.2.8.1. Obtención de proteínas	75
3.2.8.1.1. Extracción de proteínas totales de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> para ensayos de Western blot	75
3.2.8.1.2. Preparación de extractos proteicos nucleares de inflorescencias de coliflor	75
3.2.8.2. Cuantificación de proteínas totales	76
3.2.8.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	77
3.2.8.4. Técnica de Western blot	78
3.2.8.5. Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas recombinantes	78
3.2.8.6. Ensayo de defosforilación de extractos proteicos de <i>Arabidopsis thaliana</i> con fosfatasa alcalina	79
3.2.8.7. Ensayo <i>in vitro</i> de interacción ADN-proteínas	79
3.2.8.7.1. Ensayos de retardo en gel (Band shift)	79
3.2.8.8. Ensayo de interacción proteína-proteína <i>in vitro</i> (pull-down)	80
3.2.8.7. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	81
3.2.8.7.1. Proteínas recombinantes fusionadas a glutatión S-transferasa	81

3.2.8.7.2. Proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP)	81
3.2.8.7.3. Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	82
3.2.8.7.3.1. Purificación de las proteínas de fusión con GST	82
3.2.8.7.3.2. Purificación de las proteínas de fusión con MBP	83
3.2.9. Metodologías empleadas con plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
3.2.9.1. Transformación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	84
3.2.9.2. Selección de las plantas de <i>Arabidopsis</i> transformadas	85
3.2.9.3. Análisis de plantas de <i>Arabidopsis</i> transformadas	86
3.2.9.4. Análisis de la expresión del gen reportero en plantas transformadas	87
3.2.9.4.1. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa	87
3.2.9.4.2. Análisis fluorométrico de la actividad β -glucuronidasa en plantas transformadas	88
3.2.9.5. Ensayos del efecto de distintos compuestos sobre la expresión del gen reportero en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	89
3.2.9.6. Ensayo de transformación transiente de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	90
ANEXO I	92
ANEXO II	96
4. RESULTADOS	100
4.1 CAPÍTULO 1: ESTUDIOS FUNCIONALES DE LAS REGIONES PROMOTORAS DE LOS GENES <i>ATCOX6A</i>, <i>ATCOX6B-1</i>, <i>ATCOX6B-2</i> Y <i>ATCOX6B-3</i> DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	100

4.1.1 Introducción	100
4.1.2 Resultados	100
4.1.2.1 Análisis de las secuencias promotoras de los genes <i>AtCOX6a</i> , <i>AtCOX6b-1</i> , <i>AtCOX6b-2</i> y <i>AtCOX6b-3</i>	101
4.1.2.1.1 Búsqueda de elementos transcripcionales putativos en las secuencias promotoras de los genes <i>AtCOX6a</i> , <i>AtCOX6b-1</i> , <i>AtCOX6b-2</i> y <i>AtCOX6b-3</i>	101
4.1.2.1.2 Alineamiento de las regiones promotoras analizadas	107
4.1.2.2 Clonado de las secuencias promotoras de los genes <i>AtCOX6a</i> , <i>AtCOX6b-1</i> , <i>AtCOX6b-2</i> y <i>AtCOX6b-3</i> en pBI101.3	107
4.1.2.3 Análisis de las plantas transgénicas	
4.1.2.3.1 Selección y análisis de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas	109
4.1.2.3.2 Análisis histoquímico de expresión del gen <i>gus</i> en plantas transformadas	109
4.1.2.3.2.1 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI- <i>AtCOX6a</i>	109
4.1.2.3.2.2 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI- <i>AtCOX6b-1</i>	111
4.1.2.3.2.3 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI- <i>AtCOX6b-2</i>	112
4.1.2.3.2.4 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI- <i>AtCOX6b-3</i>	113
4.1.2.3.2.5 Acortamientos sucesivos de las regiones promotoras	

de los genes <i>AtCOX6a</i> , <i>AtCOX6b-1</i> , <i>AtCOX6b-2</i> y <i>AtCOX6b-3</i>	115
4.1.2.3.2.6 Mutagénesis sitio dirigida de los elementos <i>site II</i> en las regiones promotoras analizadas	115
4.1.2.3.2.6.1 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcciones pBI-COX6a(mutS2), pBI-COX6b-1(mutS2), pBI-COX6b-2(mutS2) y pBI-COX6b-3(mutS2)	116
4.1.2.3.3 Análisis fluorométrico de actividad GUS en extractos de plantas transgénicas	121
4.1.2.3.3.1 Análisis fluorométrico de actividad GUS en plántulas	121
4.1.2.3.3.2 Análisis fluorométrico de actividad GUS en distintos órganos de plantas transformadas	123
4.1.2.4 Análisis de la interacción <i>in vitro</i> entre los fragmentos de las regiones promotoras de los genes <i>AtCOX6</i> y proteínas de un extracto nuclear de inflorescencias - Ensayos de movilidad electroforética en geles de retardo (Band shift)	127
4.1.2.5 Efecto de distintos agentes físicos y químicos sobre la actividad de las regiones promotoras de <i>AtCOX6a</i> , <i>AtCOX6b-1</i> , <i>AtCOX6b-2</i> y <i>AtCOX6b-3</i>	131
4.1.2.5.1 Ensayos con distintos agentes físicos y químicos en plantas transformadas con las construcciones que contienen los distintos acortamientos de las regiones promotoras en estudio	135
4.1.2.5.2 Búsqueda de posibles elementos comunes de respuesta a sacarosa en los promotores de los genes <i>AtCOX6b</i>	139
4.1.2.5.3 Análisis de la respuesta de las plantas transformadas con las construcciones pBI- <i>AtCOX6b-1</i> y sus acortamientos frente a giberelinas.	

Búsqueda de posibles sitios de respuesta a la hormona en el promotor del gen <i>AtCOX6b-1</i>	144
4.1.2.5.4 Análisis de la respuesta de las plantas transformadas con las construcciones pBI- <i>AtCOX6b-3</i> y sus acortamientos frente a citoquininas.	
Búsqueda de posibles sitios de respuesta a la hormona en el promotor del gen <i>AtCOX6b-3</i>	145
4.1.2.5.5 Efecto de la mutación de los motivos <i>site II</i> de las regiones promotoras en estudio en la respuesta frente a distintos agentes físicos y químicos	147
4.1.3 DISCUSIÓN	150
4.2 CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS GENES <i>ATMAGO</i>, <i>ATY14</i> Y <i>ATPYM</i> DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	164
4.2.1 Introducción	164
4.2.2 ESTUDIOS FUNCIONALES DE LAS SECUENCIAS PROMOTORAS DE LOS GENES <i>ATMAGO</i>, <i>ATY14</i> Y <i>ATPYM</i> DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	166
4.2.2.1 Búsqueda de elementos transcripcionales putativos en las secuencias promotoras de los genes <i>AtMAGO</i> , <i>AtY14</i> y <i>AtPYM</i>	166
4.2.2.2 Clonado de las secuencias promotoras de los genes <i>AtMAGO</i> , <i>AtY14</i> y <i>AtPYM</i> en pBI101.3	170
4.2.2.3 Análisis de las plantas transgénicas	172

4.2.2.3.1 Selección y análisis de las plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> transformadas	172
4.2.2.3.2 Análisis histoquímico de la expresión del gen <i>gus</i> en plantas transgénicas	172
4.2.2.3.2.1 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtMago	172
4.2.2.3.2.2 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtY14	174
4.2.2.3.2.3 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtPym	176
4.2.2.3.2.4 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtMago(mutS2-2)	177
4.2.2.3.2.5 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtY14(mutS2-1)	179
4.2.2.3.2.6 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtY14(mutS2-2)	179
4.2.2.3.2.7 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtY14(mutS2)	181
4.2.2.3.2.8 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtPym(mutS2)	183
4.2.2.3.3 Análisis fluorométrico de actividad GUS en plántulas transgénicas	185
4.2.2.3.3.1 Análisis fluorométrico de actividad GUS en plántulas transformadas con las construcciones pBI-AtMago,	

pBI-AtMago(ACORT), pBI-AtMago(mutS2-2) y pBI-AtMago(mutS2)	185
4.2.2.3.3.2 Análisis fluorométrico de actividad GUS en plántulas transformadas con las construcciones pBI-AtY14, pBI-AtY14(ACORT), pBI-AtY14(mutS2-1), pBI-AtY14(mutS2-2) y pBI-AtY14(mutS2)	186
4.2.2.3.3.3 Análisis fluorométrico de actividad GUS en plántulas transformadas con las construcciones pBI-AtPym, pBI-AtPym(mutS2-1), pBI-AtPym(mutS2-2) y pBI-AtPym(mutS2)	187
4.2.2.3.3.4 Análisis fluorométrico de actividad GUS en distintos órganos de plantas transformadas	189
4.2.2.4 Análisis de la interacción <i>in vitro</i> entre los fragmentos de las regiones promotoras de los genes <i>AtMAGO</i> , <i>AtY14</i> y <i>AtPYM</i> – Ensayos de movilidad electroforética en geles de retardo (Band shift)	192
4.2.2.5 Análisis del intrón ubicado en la región 5'UTR y del primer exón del gen <i>AtPYM</i> en la regulación de su expresión génica	194
4.2.2.5.1 Deleción del intrón líder y del primer exón en el gen <i>AtPYM</i>	194
4.2.2.5.1.1 Análisis histoquímico de las plantas transformadas con las construcciones pBIAt-Pym(-I) y pBIAt-Pym(-E1)	195
4.2.2.5.2 Análisis del efecto de los elementos <i>site II</i> , del intrón <i>líder</i> y del primer exón del gen <i>AtPYM</i> sobre la expresión a nivel de ARNm	197
4.2.2.6 Enriquecimiento de los motivos <i>site II</i> en las regiones promotoras de los genes constituyentes del EJC	199
4.2.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ATMAGO, ATY14 Y ATPYM EN ARABIDOPSIS THALIANA	202
4.2.3.1 Obtención de plantas que sobreexpresan las proteínas en estudio	202

4.2.3.2 Ensayos de Western blot en condiciones no desnaturalizantes	203
4.2.3.3 Defosforilación de extractos proteicos y su efecto en la formación del complejo AtMago-AtY14-AtPym	204
4.2.3.4 Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> de las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym expresadas en forma recombinante	206
4.2.3.5 Ensayo de defosforilación de las proteínas AtY14 y AtPym	208
4.2.3.6 Ensayo de interacción proteína-proteína <i>in vitro</i> (pull-down)	209
4.2.3.7 Efecto de la sobreexpresión de las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym sobre la expresión de genes que poseen un intrón en su región 5'UTR	213
4.2.4 DISCUSIÓN	219
5. CONCLUSIONES	230
6. RESUMEN	234
7. ABSTRACT	241
8. BIBLIOGRAFÍA	247

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la oxidación aeróbica de los ácidos grasos y las hexosas (preferentemente glucosa), éstos son metabolizados a CO_2 y H_2O , y la energía liberada se convierte en la energía química de los enlaces fosfato anhidro del ATP. En las células animales y en la mayoría de las otras células no fotosintéticas, el ATP se forma principalmente por este proceso. Los pasos iniciales en la oxidación de la glucosa, proceso llamado *glucólisis*, transcurren en el citosol, tanto en eucariotas como en procariotas, y no necesitan O_2 . Los pasos finales, que requieren O_2 , generan la mayor parte del ATP. En los eucariotas, las etapas finales de la oxidación aeróbica tienen lugar en las *mitocondrias*, mientras que en los procariotas, que carecen de mitocondrias, muchos de los últimos pasos se producen en la membrana plasmática (Lodish y col., 2005).

1.1 La mitocondria

La mayoría de los organismos eucariotas contienen un gran número de mitocondrias, las cuales ocupan más del 25% del volumen del citoplasma (Lodish y col., 2005). Son organelas celulares cuyo diámetro es de aproximadamente 0,5 a 1 μm . Se las encuentra generalmente asociadas a los microtúbulos y su número y forma son bastante variables. En ellas se desarrollan los procesos energéticos más importantes del metabolismo aeróbico. Al igual que los cloroplastos, son semiautónomas y capaces de sintetizar proteínas y de transmitir información genética. Han sido esenciales para la evolución de los organismos pluricelulares y su tamaño las hizo factibles de ser observadas en microscopía óptica en el siglo XIX. Su número aumenta en fase de crecimiento celular y según las necesidades de ATP. Cuando aumenta el número de organelas en fase de desarrollo, en demanda de mayores disponibilidades de energía, también aumenta consecuentemente la expresión de los genes que codifican proteínas mitocondriales (Alberts y col., 2003).

1.1.1 Funciones de la mitocondria

Las mitocondrias están presentes en los organismos de los reinos animal, vegetal, protista y fungi. Su función principal es la de generar energía disponible en forma de ATP para el normal funcionamiento del metabolismo celular. Son organoides delimitados por dos membranas muy diferentes, externa e interna. Entre ellas, queda delimitado un espacio (espacio intermembrana) y el conjunto encierra una matriz o compartimiento central. Debido a la complejidad de los procesos metabólicos que involucra y su relación funcional con los cloroplastos y el núcleo, es uno de los organoides celulares más estudiados (Alberts y col., 2003).

La membrana externa define el perímetro exterior liso de la mitocondria y contiene la *porina* mitocondrial, un canal proteico transmembrana de estructura similar a la de las porinas bacterianas. Los iones y la mayoría de las moléculas pequeñas (hasta unos 5000 Da) pueden atravesar con facilidad estos canales proteicos. Aunque el flujo de metabolitos a través de la membrana externa limitaría su velocidad de oxidación en la mitocondria, la membrana interna es la principal barrera de permeabilidad entre el citosol y la matriz mitocondrial. Las proteínas constituyen el 76% del total del peso de la membrana interna (una fracción mayor que la de cualquier otra membrana de la célula). La cardiolipina (difosfatidilglicerol), un lípido concentrado en la membrana interna, reduce suficientemente la permeabilidad de la membrana a los protones, de manera que se puede establecer una fuerza protón-motriz a través de ella (Lodish y col., 2005).

La membrana interna y la matriz mitocondrial son los sitios de la mayoría de las reacciones que intervienen en la oxidación del piruvato y los ácidos grasos a CO_2 y H_2O , como también en la síntesis acoplada de ATP a partir de ADP y Pi. En estos procesos complejos hay muchos pasos, pero las reacciones pueden subdividirse en tres grupos, cada uno de los cuales se da en una membrana o un espacio bien definidos de la mitocondria:

1. Oxidación de piruvato y ácidos grasos a CO_2 , acoplada a la reducción de las coenzimas NAD^+ y FAD^+ a NADH y FADH_2 , respectivamente. Estas reacciones

tienen lugar en la matriz o en proteínas de la membrana interna que miran hacia la matriz.

2. Transferencia de electrones del NADH o FADH₂ al O₂. Estas reacciones se producen en la membrana interna y están acopladas a la generación de una fuerza protón-motriz a través de ella.
3. Aprovechamiento de la energía almacenada en el gradiente electroquímico de protones para la síntesis de ATP por el complejo F₀F₁ en la membrana interna.

La membrana mitocondrial interna posee gran cantidad de repliegues o crestas, que aumentan mucho su superficie e incrementan su capacidad para generar ATP (Figura 1) (Lodish y col., 2005).

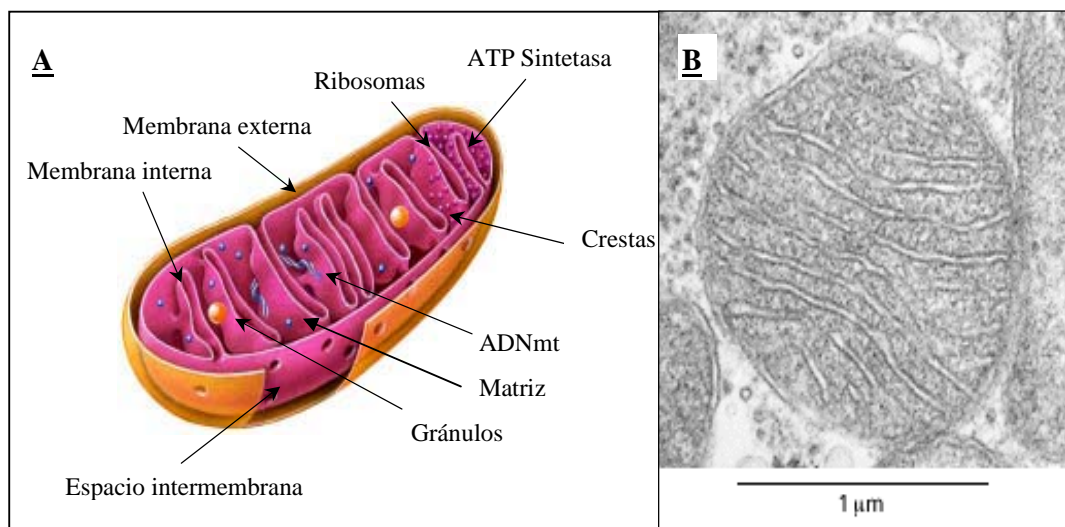


Figura 1: (A) Diagrama tridimensional de un corte longitudinal de una mitocondria. Las esferas rojas señalan los complejos F₀F₁ que sintetizan ATP en la membrana interna. El ADN mitocondrial se visualiza como una hebra de color azul. Los ribosomas están representados como esferas pequeñas azules y los gránulos como esferas grandes de color amarillo (extraído de Lodish y col., 2005). (B) Micrografía electrónica de una mitocondria.

1.2 Mitocondrias de plantas

1.2.1 Funciones de las mitocondrias de plantas

Las células vegetales presentan características particulares que las distinguen de las células animales y de hongos. Algunas de ellas son:

- ❖ Poseen cloroplastos capaces de sintetizar ATP y cadenas carbonadas, que participan de sus propios procesos metabólicos
- ❖ Respiran a expensas de la luz solar (fotorrespiración)
- ❖ Producen metabolitos primarios y secundarios en respuesta a ciertas agresiones

Estas particularidades permiten que las mitocondrias de plantas participen en procesos metabólicos característicos y que las distinguen de sus pares de organismos no fotosintéticos (Mackenzie y McIntosh, 1999).

Existen numerosas evidencias que ponen de manifiesto el importante rol de las mitocondrias de plantas cuando las mismas son sometidas a un determinado estrés. En este sentido, mitocondrias aisladas de células de papa provenientes de plantas aclimatadas al estrés hídrico presentaron una mayor actividad de varios transportadores (entre ellos, canales de potasio) relacionados al estrés oxidativo y mantenimiento energético celular (Fратиanni y col., 2001). Asimismo, en arveja, se ha observado una mayor importación de precursores de proteínas a la mitocondria cuando se sometió a la planta a estrés hídrico, lo que sugeriría una mayor capacidad de biogénesis y reparación celular (Taylor y col., 2003). Klein y col. (1986) encontraron una respuesta diferenciada de las mitocondrias de trigo sometido a estrés osmótico, de acuerdo al tejido u órgano analizado. Por ejemplo, la permeabilidad iónica y la composición fosfolipídica resultaron ser marcadamente diferentes en las mitocondrias de raíz y tallo comparadas con dichas organelas de plántulas.

Otra característica de las mitocondrias de plantas (aunque también de las de protistas y hongos), es la presencia de una vía de respiración adicional resistente a cianuro, constituida por una oxidasa que recibe los electrones provenientes de la cadena

respiratoria directamente de la ubiquinona. Esta vía alternativa se induce en presencia de estrés ambiental y no está asociada a la producción de un gradiente protónico ni de ATP. Cuando la vía de transporte de electrones mediada por los citocromos se satura, la producción de esqueletos carbonados a través del ciclo de Krebs se ve limitada y la oxidasa alternativa se acopla al mismo de manera tal de compensar la demanda de compuestos carbonados. Con la acción conjunta del ciclo de Krebs y la vía respiratoria alternativa se consigue un aumento del flujo de compuestos carbonados y el consiguiente mantenimiento de los procesos anabólicos (Mackenzie y McIntosh, 1999). La activación de la oxidasa alternativa se consigue mediante la reducción de un puente disulfuro (Umbach y Siedow, 1993) y el ambiente reductor necesario sería provisto aparentemente por el NADH proveniente del ciclo de Krebs (Day y Wiskich, 1995).

La mitocondria es una gran productora de especies reactivas de oxígeno (ROS). En condiciones de estrés ambiental esta producción se ve incrementada, como así también la síntesis de oxidasa alternativa, la cual a su vez aumenta la producción de esqueletos carbonados y compuestos capaces de mermar el daño producido por las ROS en las células vegetales. Este constituye un mecanismo muy importante con el que cuentan las plantas para superar las condiciones ambientales adversas (Wagner y Moore, 1997).

Además de la oxidasa alternativa, las mitocondrias vegetales presentan una gran diversidad de deshidrogenasas dependientes de NAD^+ ó NADP^+ en la cadena de transporte de electrones, que tampoco contribuyen al gradiente protónico ni a la síntesis de ATP. Existen por los menos cuatro NAD(P)H deshidrogenasas en la membrana interna mitocondrial (además del complejo I o NADH deshidrogenasa), dos de ellas orientadas hacia el espacio intermembrana y las otras dos hacia la matriz mitocondrial. Estas últimas constituyen una vía resistente a rotenona que permite la oxidación del NADH proveniente del ciclo de Krebs (Moller y Rasmusson, 1998).

En la membrana mitocondrial interna los complejos enzimáticos, entre ellos la citocromo oxidasa, están constituidos por subunidades proteicas, codificadas algunas de ellas en el genoma mitocondrial y las restantes en el genoma nuclear. Es por lo tanto

esperable que ambos compartimentos celulares se encuentren estrechamente comunicados. Sin embargo muchas de estas señales son aún desconocidas (Mackenzie y McIntosh, 1999).

1.2.2 Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa

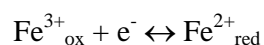
La mayor parte de la energía libre que se produce durante la oxidación de la glucosa a CO_2 es retenida en las coenzimas reducidas NADH y FADH_2 , generadas en la glucólisis y el ciclo de Krebs. Durante la *respiración* se liberan electrones del NADH y el FADH_2 , que al final son transferidos al O_2 para formar H_2O (Lodish y col., 2005).

La energía liberada en la oxidación de una sola molécula de NADH o FADH_2 por el O_2 es suficiente para impulsar la síntesis de varias moléculas de ATP a partir de ADP y Pi. La mitocondria torna máxima la producción de ATP mediante la transferencia de electrones del NADH y del FADH_2 a través de una serie de transportadores electrónicos, todos ellos menos uno componentes integrales de la membrana interna. Esta transferencia electrónica, paso a paso a través de la *cadena de transporte de electrones*, también llamada *cadena respiratoria*, permite que la energía del NADH y el FADH_2 se libere en cantidades pequeñas. En varios sitios durante el transporte electrónico desde el NADH hacia el O_2 , desde la matriz mitocondrial se transportan protones a través de la membrana interna de la mitocondria y a través de ella se forma un gradiente de concentración protónica. Como la membrana externa es libremente permeable a los protones, el pH de la matriz mitocondrial es más alto (es decir que la concentración protónica es más baja) que el del citosol y el espacio intermembrana. También se produce un potencial eléctrico a través de la membrana interna, como resultado del bombeo de los protones con carga positiva hacia fuera de la matriz, que se torna negativa respecto del espacio intermembrana. Así, la energía liberada durante la oxidación de NADH o FADH_2 se almacena tanto en la forma de un potencial eléctrico como de un gradiente de concentración de protones a través de la membrana interna, lo que en conjunto se conoce como *fuerza protón-motriz*. El movimiento de los protones, impulsados por esta fuerza desde el espacio intermembrana

hacia la matriz, está acoplado a la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi por el complejo F₀F₁ (Lodish y col., 2005).

La síntesis de ATP propulsada por la transferencia de electrones del NADH o el FADH₂ hacia el O₂ es la principal fuente de ATP en las células aerobias no fotosintéticas. Muchos datos indican que en las mitocondrias y las bacterias, este proceso, denominado *fosforilación oxidativa*, depende de la generación de un gradiente electroquímico de protones (o sea una fuerza protón-motriz) a través de la membrana interna. El transporte de electrones, el bombeo de protones y la síntesis de ATP son acontecimientos simultáneos (Alberts y col., 2003).

Los *citocromos* son proteínas ligadas a una molécula de hemo, un grupo prostético con contenido de hierro similar al de la hemoglobina o la mioglobina. El transporte de electrones se produce por la oxidación y la reducción del átomo de Fe en el centro de dicha molécula:

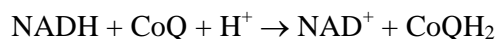


En la cadena de transporte de electrones éstos se mueven a través de los citocromos en el siguiente orden: b, c1, c, a y a3 (figura 2). Los diversos citocromos poseen grupos hemo y ligandos axiales ligeramente diferentes, lo que genera ambientes distintos para los iones Fe.

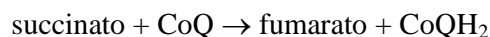
La coenzima Q (CoQ), también llamada ubiquinona, es el único transportador de electrones que no es un grupo prostético unido a una proteína. Es un transportador de átomos de hidrógeno (protones más electrones). La forma de quinona oxidada de la CoQ puede aceptar un solo electrón para formar una semiquinona, y luego un segundo electrón y dos protones para generar la forma completamente reducida, la dihidrobiquinona. Tanto la CoQ como la forma reducida CoQH₂ son solubles en los fosfolípidos y difunden con libertad a través de la membrana mitocondrial interna. La CoQ acepta electrones liberados del complejo NADH deshidrogenasa y el complejo succinato deshidrogenasa (Lodish y col., 2005).

Los complejos involucrados en los procesos descriptos son:

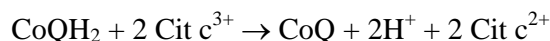
➤ **Complejo I (NADH deshidrogenasa):** Los electrones son transportados desde el NADH a la CoQ por el complejo NADH deshidrogenasa. El NAD⁺ es exclusivamente un transportador de dos electrones: acepta o libera un par de ellos a la vez. En dicho complejo los electrones primero fluyen del NADH al mononucleótido de flavina (FMN), y luego a una proteína con hierro y azufre. El FMN, lo mismo que el FAD, puede aceptar dos electrones, pero de a uno por vez. La reacción general catalizada por este complejo es:



➤ **Complejo II (succinato deshidrogenasa):** Esta enzima es un componente integral del complejo succinato-CoQ reductasa. Los dos electrones liberados en la conversión del succinato a fumarato se transfieren primero al FAD, luego a un transportador con hierro-azufre y por último a la CoQ, para formar la CoQH₂ (reducida). El complejo II no transloca protones a través de la membrana interna y no se genera una fuerza protón-motriz en esta parte de la cadena de transporte de electrones. La reacción general catalizada por este complejo es:

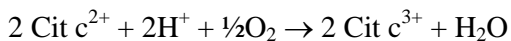


➤ **Complejo III (citocromo b-c₁ o citocromo c reductasa):** La CoQH₂ (reducida), generada por la oxidación del NADH o del succinato, cede dos electrones al complejo III y regenera la CoQ (oxidada). Dentro de este complejo, los electrones son transferidos a una proteína con hierro-azufre y a dos citocromos b, y luego al citocromo c₁. Por último, los dos electrones son transferidos a dos moléculas de la forma oxidada del citocromo c para generar citocromo c reducido. La reacción general catalizada por este complejo es:



➤ **Complejo IV (citocromo c oxidasa):** El citocromo c, tras haber sido reducido por el complejo III, transporta electrones, de a uno, al complejo citocromo c oxidasa. Dentro de este complejo, los electrones son transferidos, siempre de a uno, primero a un par de iones de cobre (Cu_b²⁺) y al citocromo a₃, y por último al O₂, el aceptor

electrónico definitivo que se reduce a una molécula de H₂O. La reacción general catalizada por este complejo es:



Durante el transporte de cada par de electrones a través del complejo citocromo c oxidasa se translocan dos protones a través de la membrana mitocondrial interna (Lodish y col., 2005).

➤ **Complejo V (ATP sintetasa):** Este complejo utiliza la fuerza protón-motriz generada para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (figura 2) (Alberts y col., 2003).

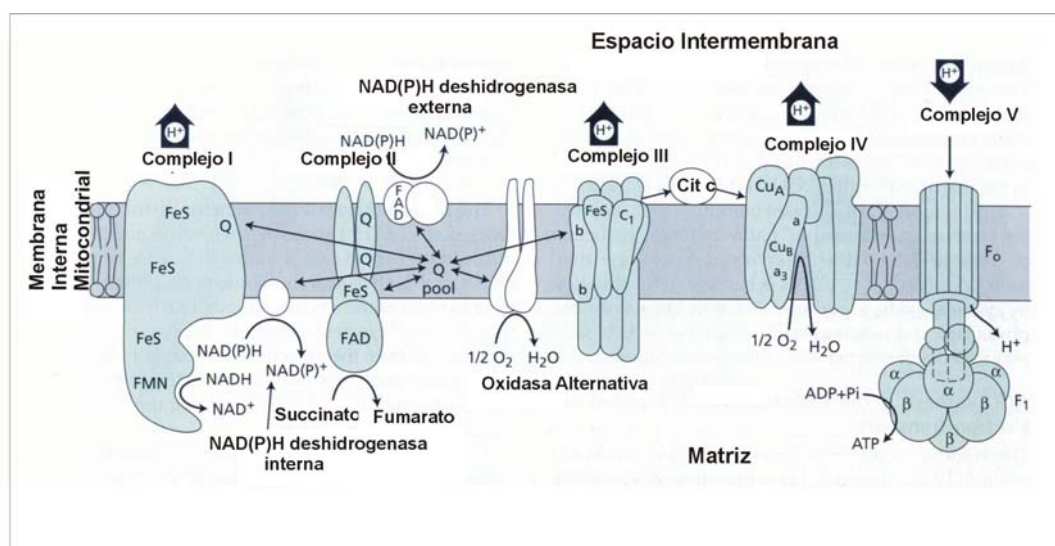


Figura 2: Esquema de la organización de la cadena de transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial de plantas. Complejo I (NADH deshidrogenasa). Complejo II (succinato deshidrogenasa). Complejo III (citocromo c reductasa). Complejo IV (citocromo c oxidasa). Complejo V (ATP sintetasa). En la figura se observan además las NAD(P)H deshidrogenasas y la oxidasa alternativa, características de las mitocondrias vegetales.

1.2.3 Genoma mitocondrial de plantas

La mayoría de los genomas de organelas presentan la forma de una única molécula de ADN circular. Existen unas pocas excepciones donde el ADN mitocondrial es una molécula lineal, generalmente en eucariotas inferiores.

Las células vegetales presentan, a diferencia de otras células eucariotas, varios tipos de ADN mitocondrial (ADNmt), los que pueden recombinarse para dar lugar a nuevas moléculas de tamaños variables (Quetier y col., 1985).

La presencia de secuencias repetidas directas e invertidas, secuencias no codificantes, entre ellas intrones y regiones espaciadoras ubicadas entre genes individuales, y eventos tales como integraciones génicas o recombinaciones, conducen a la gran variabilidad en tamaño y estructura que presenta el genoma mitocondrial en las plantas. Es por esto que no resulta sorprendente que el genoma mitocondrial de ciertas especies vegetales alcance un tamaño de 2000 Kpb, mientras que en animales ronda los 16 Kpb (Mackenzie y McIntosh, 1999). Existen varios cientos de mitocondrias por célula. Cada mitocondria posee, además, varias copias de ADN, pero la cantidad total de ADN mitocondrial comparado con el del núcleo es pequeña (menos del 1%) (Lewin, 2004).

Las mitocondrias de plantas contienen genes que codifican varias proteínas ribosomales, la mayoría de los ARNt y los ARNr 18S y 26S, todos ellos necesarios para la síntesis de proteínas mitocondriales. Además, poseen genes que codifican componentes de la cadena respiratoria, entre ellos tres subunidades del complejo citocromo c oxidasa, una subunidad del complejo citocromo c reductasa, tres subunidades de la ATP sintetasa y varias subunidades de la NADH-deshidrogenasa, genes involucrados en la biogénesis del citocromo c y genes que constituyen marcos abiertos de lectura conservados (Schuster y Brennicke, 1994).

La cantidad de ARNt codificados en el genoma mitocondrial varía según la especie. En general, éstos no resultan suficientes para constituir un sistema decodificador completo, y por esto muchos ARNt son importados desde el citoplasma.

En el caso de *Arabidopsis thaliana*, se identificaron 22 genes mitocondriales que codifican ARNt y 6 ARNt son importados desde el citoplasma (Unselde y col., 1997).

El genoma mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* tiene un tamaño de 357 Kpb y contiene 57 genes y 26 marcos abiertos de lectura. Entre los genes que integran su ADNmt se encuentran *nad1* a *nad9* del complejo I, *cob* del complejo III, *cox1*, 2 y 3 del complejo IV, *atp1*, 6 y 9 del complejo V, genes relacionados con la biogénesis del citocromo c, como así también aquellos que codifican los ARNr 5S, 18S y 26S y los codificantes de las proteínas ribosomales rpl2, 5 y 16 y rps3, 4, 7 y 12 (Unselde y col., 1997).

En cuanto a la regulación de la expresión de los genes que integran el genoma mitocondrial, el procesamiento de los transcritos dirigido por el núcleo es el mecanismo preponderante que emplean las células vegetales para lograrla (Gray y col., 1992). Los genes mitocondriales *nad1*, *nad2* y *nad5* de ciertas plantas, que codifican las correspondientes subunidades de la enzima NADH deshidrogenasa, requieren del proceso de trans-splicing para un ensamblaje funcional de sus ARNm (Malek y Knoop, 1998).

Existe además otro mecanismo de regulación de la expresión génica mitocondrial basado en la conversión de citosina a uracilo en el ARNm. Este procesamiento, conocido como editado del ARNm, se produce tanto en el interior del marco de lectura como así también dentro de los codones de iniciación y terminación, y en algunos casos en intrones (Pring y col., 1993). El grado de editado de los diferentes transcritos varía de acuerdo a las condiciones de crecimiento, al tipo de tejido vegetal y a la etapa de desarrollo (Grooskopf y Mulligan, 1996).

1.2.4 Migración de genes mitocondriales al núcleo e interacción entre ambos genomas

La teoría endosimbiótica fue postulada inicialmente por Lynn Margulis en 1967 y explica la reducción del genoma mitocondrial en los organismos eucariotas debido a

una migración evolutiva de genes desde la organela al núcleo. Estos genes, una vez en el núcleo, reemplazaron funcionalmente a los genes mitocondriales.

Varios genes mitocondriales son derivados de sus ancestros endosimbióticos bacterianos. Sin embargo, estos genes residen en el genoma nuclear en vez de permanecer en la organela. Para convertirse en un gen activo y retornar a la organela como una proteína funcional, éste debe primero ser “asimilado” dentro del genoma nuclear. Además, el gen debe ser transcrito y adquirir una secuencia de tránsito que le permita a la proteína, una vez sintetizada, ser transportada al destino celular apropiado (Schuster y col., 1993). Estas presecuencias o péptidos señal localizados en el extremo amino terminal son generalmente ricos en cargas positivas y aminoácidos hidroxilados y contienen pocos residuos ácidos. Regularmente alternan residuos básicos e hidrofóbicos y poseen la capacidad para generar α -hélices anfipáticas (Sjølving y Glaser, 1998). La presecuencia interacciona con otras proteínas en su transporte a la organela, entre ellas chaperonas citosólicas, receptores externos de la mitocondria y translocasas propias de las dos membranas mitocondriales.

La maquinaria de importación con la que cuentan las mitocondrias ha sido muy bien caracterizada en levaduras, particularmente en *Saccharomyces cerevisiae*. En la membrana externa de la organela se ubica un complejo proteico con actividad translocasa, conocido como TOM (por sus siglas en inglés, *Translocase of Outer Membrane*). Este complejo está constituido por siete proteínas y el reconocimiento del péptido señal es realizado por dos receptores capaces de identificar precursores en el péptido de tránsito de la proteína a ser importada, denominados TOM20 y TOM70 (Wiedemann y col., 2004).

En la membrana interna se encuentran dos translocasas (TIM, del inglés *Translocase of Inner Membrane*), denominadas TIM 17:23 y TIM22. Estas proteínas actúan en el mecanismo de importación a la matriz mitocondrial y en la vía que permite la incorporación de proteínas en la membrana interna, y que ejercerían, respectivamente, funciones metabólicas y de transporte (Pfanner y Geissler, 2001).

Una vez en el interior de la mitocondria, una peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP) cliva la presecuencia generando la proteína madura y funcional. Entre las chaperonas citosólicas más importantes que cumplen un rol fundamental en la importación de proteínas a la mitocondria, se encuentra HSP70, asociada a la cara citosólica de la membrana externa mitocondrial. La concentración de esta proteína es variable y depende fundamentalmente del estadio del desarrollo en el que se encuentra la célula (Mooney y Harmey, 1996).

Se ha demostrado que la migración de información genética desde la mitocondria al núcleo contempla desde secuencias nucleotídicas pequeñas de menos de 150 pb hasta genes completos o incluso complejos génicos (Blanchard y Lynch, 2000). La interacción entre los genomas nuclear y mitocondrial se pone de manifiesto en el carácter quimérico que presentan algunas proteínas mitocondriales, entre ellas la citocromo c reductasa, la citocromo c oxidasa y el complejo V (ATP sintetasa) de la cadena de transporte de electrones (Poyton y col., 1992). Otro caso que ejemplifica lo antes expuesto lo constituye la existencia de un fragmento del cromosoma II de *Arabidopsis thaliana* que se corresponde con ADN de origen mitocondrial (Blanchard y Lynch, 2000).

El complejo citocromo c oxidasa está formado por subunidades proteicas, algunas de ellas codificadas en el genoma mitocondrial y otras en el genoma nuclear. Las señales que vinculan a la mitocondria con el núcleo, en su mayoría, son aún desconocidas (Mackenzie y McIntosh, 1999) (figura 3).

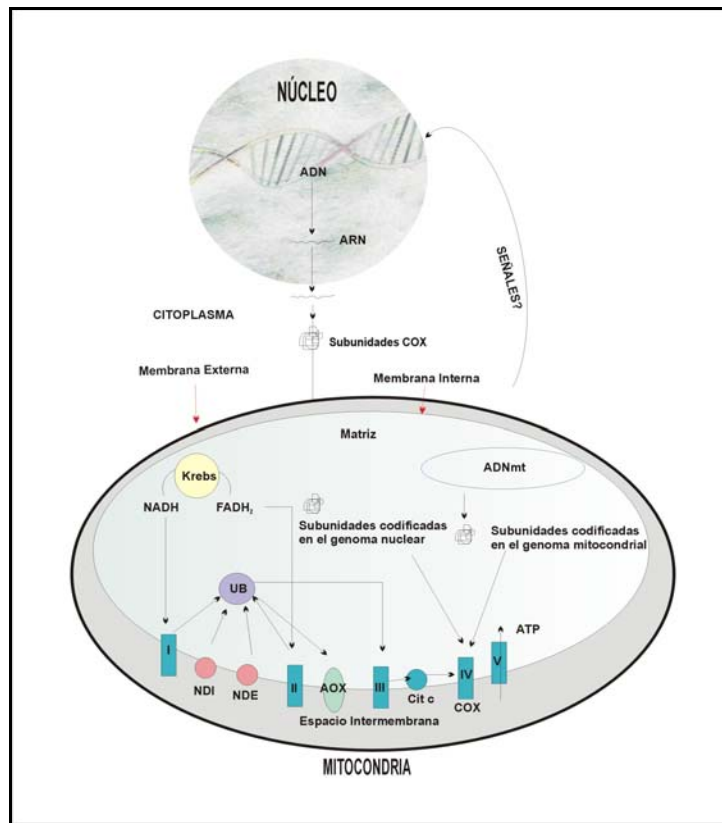


Figura 3: Interacción entre la mitocondria y el núcleo en las células vegetales durante la síntesis de subunidades de la citocromo c oxidasa. Las subunidades codificadas en el genoma nuclear son sintetizadas en el citoplasma y transportadas a la matriz mitocondrial, donde son ensambladas en la membrana interna con las subunidades codificadas en la organela. NDI: NADH deshidrogenasa interna; NDE: NADH deshidrogenasa externa; I, II, III, IV y V: complejos de la cadena respiratoria; Cit c: citocromo c; AOX: oxidasa alternativa; UB: ubiquinona; ADNmt: ADN mitocondrial.

La interacción entre el núcleo celular y la mitocondria implica un flujo bidireccional, que involucra proteínas codificadas en el genoma nuclear, que son importadas por la organela luego de ser sintetizadas en el citosol, y señales metabólicas, tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS). Asimismo, participan en esta comunicación metabolitos que condicionan la fosforilación y defosforilación de factores de transcripción específicos (Poyton y McEwen, 1996).

Según Drouin y Dover (1987), a lo largo de la evolución se produjo una transferencia de genes desde la mitocondria al núcleo por medio de intermediarios de

ARN. En particular, se encontraron evidencias de tal migración en mitocondrias vegetales, que poseen secuencias homólogas a una transcriptasa reversa y su correspondiente actividad enzimática. El hallazgo de pseudogenes en los genomas nucleares sugiere que también existiría actividad transcriptasa reversa en citoplasma y/o núcleo de células vegetales.

En 1999, Adams y colaboradores realizaron el análisis de los genomas nucleares de 392 géneros de Leguminosas y comprobaron que en ciertos casos el gen *cox2* (codificante de la subunidad II de la citocromo *c* oxidasa) no está presente en el genoma mitocondrial, mientras que en otros casos el gen sí está presente en la organela pero no se transcribe. Además, sugirieron que la transferencia de dicho gen resulta de un evento evolutivamente reciente, involucrando intermediarios de ARN. Al ser importado al núcleo, el gen *cox2* adquirió dos secuencias: un dominio para el péptido de tránsito y un intrón que divide la región codificante de dicho péptido y el segundo exón que codifica la proteína madura. Se propuso un mecanismo que comprende tres etapas para explicar la transferencia de este gen: migración al núcleo, activación del gen nuclear e inactivación del gen mitocondrial y, finalmente, la pérdida de este último (Nugent y Palmer, 1991). Además, para que un gen mitocondrial sea incorporado en forma estable y eficiente, resulta necesaria la presencia de un promotor que posibilite la transcripción del mismo en el núcleo, secuencias específicas para que se lleve a cabo el proceso de poliadenilación del mensajero correspondiente, y la incorporación de una secuencia señal para que la proteína sintetizada en el citosol pueda ser transportada a la mitocondria. Además deben estar presentes los elementos de regulación propios de diferentes tipos de células (Taiz y Zeiger, 2006).

1.2.5 Complejo IV: Citocromo c oxidasa

1.2.5.1 Funciones del complejo citocromo c oxidasa

La citocromo c oxidasa (COX) constituye el último eslabón en la cadena de transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial. El complejo COX recibe

electrones del citocromo c y los transfiere al oxígeno, que se reduce formando agua. De esta manera, por cada cuatro electrones transportados a través del complejo IV, se translocan cuatro protones en contra del gradiente de concentración, desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, contribuyendo a la síntesis de ATP en el complejo V (Lodish y col., 2005).

El complejo IV está presente en organismos procariotas y eucariotas. En un comienzo se estimó que el mismo sería evolutivamente posterior a la fotosíntesis oxigénica ya que se encuentra involucrado en el metabolismo aeróbico. Sin embargo, existen dos aspectos que sostienen lo contrario. Por un lado, se encontró que la citocromo c oxidasa estaba presente en el ancestro común de los dominios *Archaea* y *Bacteria*, mucho antes que las últimas desarrollaran mecanismos fotosintéticos. Por otro lado, se ha demostrado que los procesos aeróbicos son posibles aún en presencia de bajas concentraciones de oxígeno, tal como ocurre en las bacterias fijadoras de nitrógeno de los nódulos de la raíz de las leguminosas, con lo cual sería posible que el metabolismo aeróbico mediado por la citocromo c oxidasa tuviera un origen evolutivo anterior al proceso de fotosíntesis oxigénica (Castresana y col., 1994).

1.2.5.2 Estructura y biogénesis del complejo citocromo c oxidasa

La citocromo c oxidasa está constituida por subunidades proteicas codificadas en los genomas mitocondrial y nuclear, constituyendo, como ya se mencionó anteriormente, un claro ejemplo de la interacción entre ambos compartimentos celulares. Hasta el presente, las subunidades mejor caracterizadas tanto funcional como estructuralmente son las codificadas en el genoma mitocondrial: Cox1, Cox2 y Cox3. Estas tres subunidades constituyen el núcleo enzimático, mientras que las codificadas en el genoma nuclear son variables según el organismo, algunas de ellas presentan isoformas específicas de órgano en mamíferos y son las menos caracterizadas.

1.2.5.2.1 Subunidades codificadas en el genoma mitocondrial

En todos los organismos, incluso en bacterias, el núcleo enzimático de la citocromo c oxidasa está constituido por las tres cadenas polipeptídicas ya mencionadas: Cox1, Cox2 y Cox3.

En procariotas, la organización del complejo es más simple debido a que las tres subunidades codificadas en la mitocondria constituyen la enzima funcional. Este núcleo enzimático posee un grupo hemo *a* donde el ion hierro se encuentra en una configuración de bajo spin, y un sitio bimetálico compuesto por un grupo hemo *a*₃ con un ion hierro de configuración de alto spin y un ion de cobre (Cu_B). Este último es el responsable de la reducción del oxígeno molecular en la subunidad Cox1. En la subunidad Cox2 se encuentra el centro binuclear Cu_A, el que junto al hemo *a* constituye el sitio de entrada para los electrones que viajan a través de la cadena de transporte de electrones (Khalimonchuk y Rödel, 2005). Estos grupos hemo son los componentes esenciales de los citocromos *a* y *a*₃, respectivamente (Capaldi, 1990). La proteína Cox1 está formada por 12 hélices transmembrana y se dispone espacialmente de manera tal de exponer tres poros, denominados A, B y C, ubicados hacia el espacio intermembrana y hacia la matriz. El poro A, en la cara exterior (espacio intermembrana), permite el transporte del oxígeno a través del complejo IV, el poro B contiene a los grupos hemo *a*₃ y Cu_B y el poro C al grupo hemo *a* (Abramson y col., 2001). La subunidad Cox2 se relaciona estructuralmente a través del sitio Cu_A con un par de iones cobre. Esta subunidad estaría involucrada en la unión del citocromo c al complejo IV, aparentemente en un sitio cercano al centro Cu_A (Capaldi, 1990). Los cationes Fe³⁺ de los grupos hemo de los citocromos *a* y *a*₃ junto con los iones Cu²⁺ constituyen los verdaderos sistemas de oxido-reducción del complejo, donde los electrones recorren el circuito Cu_A→citocromo *a*→citocromo *a*₃→Cu_B→O₂ (figura 4) (Abramson y col., 2001).

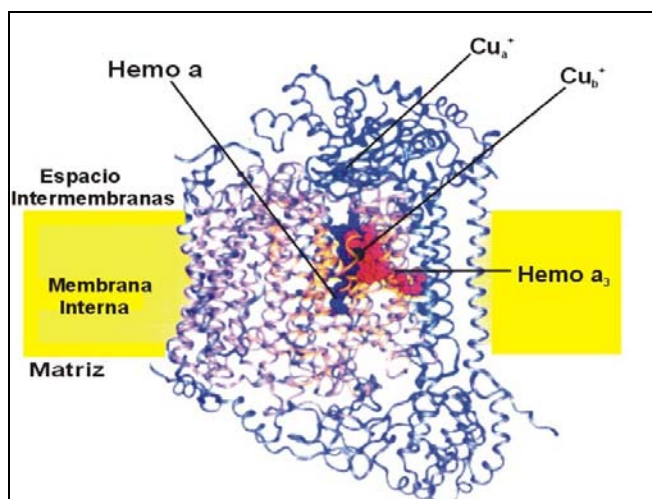


Figura 4: Estructura molecular del núcleo del complejo citocromo c oxidasa en la membrana interna mitocondrial. La subunidad Cox1 se observa en amarillo, Cox2 en azul y Cox3 en rosado. Representados en forma de esferas azules, los grupos hemo *a*, y en forma de esferas rojas, los grupos hemo *a*₃, relacionados con la subunidad Cox 1 al igual que el átomo de Cu⁺_B. El par de átomos Cu⁺_A se relaciona con la subunidad Cox 2.

La subunidad Cox3 estaría involucrada en la translocación de protones hacia el espacio intermembrana por medio de la formación de canales en la membrana mitocondrial interna. Sin embargo, se realizaron estudios que evidenciaron una significativa translocación de protones en ausencia de esta subunidad, lo que pone en tela de juicio la necesidad de la misma en dicho transporte (Capaldi, 1990).

El complejo citocromo c oxidasa, in vivo, se manifiesta en forma dimérica. Las tres subunidades codificadas en el genoma mitocondrial son polipéptidos hidrofóbicos con regiones α -hélice, propias de las proteínas transmembrana. En células vegetales esta enzima tiene aproximadamente 160 kDa y se une en forma estable a la membrana interna mitocondrial relacionándose con el citocromo c y con la matriz de la organela.

Estudios espectroscópicos de resonancia Raman pusieron en evidencia que los grupos hemo *a* y Cu_A son semejantes en mamíferos y plantas pero difieren en la resonancia del grupo formilo del hemo *a*. Este grupo químico está unido a la subunidad Cox1 por medio de enlaces hidrógeno y genera un gradiente energético diferencial que depende del estado redox del grupo hemo. Esto provee, probablemente, la fuerza

necesaria para la translocación de los protones (de Paula y col., 1990). 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⁺, pero se translocan 4 protones residuales que contribuyen a la síntesis de ATP en el complejo V. El acoplamiento de electrones y protones tiene una vía directa a través de la unión del oxígeno al grupo hemo *a*₃/Cu_B. La hélice IV de la subunidad Cox1 presenta un rulo circular por unión de una histidina a una tirosina alrededor del grupo hemo *a*₃ que genera un canal protónico de tipo D. Estos cambios conformacionales, que afectan también a las subunidades Cox2 y Cox3 a través de una lisina de posición 354 de la subunidad Cox2, generarían un segundo canal de protones de tipo K (Mills y Ferguson-Miller, 2003). Esto demostraría que la translocación contra gradiente de los protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana en el complejo IV dependería más de la asociación al oxígeno que del flujo de electrones o de los cambios conformacionales de la enzima como se creía anteriormente (Abramson y col., 2001).

Además de los cationes Fe³⁺ y Cu²⁺ que conforman el centro catalítico de la enzima, se han encontrado otros centros metálicos que no participan de las reacciones redox, pero que están estrechamente vinculados al complejo. Estos son: Na⁺, Mg²⁺ y Zn²⁺ en el complejo IV bovino; Mg²⁺ y Ca²⁺ en *Paracoccus denitrificans*. El sitio de unión del Mg²⁺ se localiza en la interfase Cox1/Cox2, en ambas especies, y está íntimamente ligado al grupo hemo *a*₃. El Ca²⁺ o el Na⁺, según el caso, se unen a un sitio en forma de “rulo” ubicado entre las hélices transmembrana I y II en la membrana interna mitocondrial. El Zn²⁺ es el único catión que no se une a Cox1 y se vincula a la subunidad Cox5b (codificada en el genoma nuclear), sobre la membrana interna, orientándose hacia la matriz mitocondrial (Abramson y col., 2001). Aunque aún se desconoce el rol que tienen estos metales sobre la funcionalidad de la enzima, el zinc podría cumplir un papel estructural en la estabilidad del complejo (Coyne y col., 2007) y el magnesio/manganeso, cercano al sitio de formación de la molécula de agua, podría

colaborar en la estabilidad y liberación del agua producida durante la reducción del oxígeno (Schmidt y col., 2003).

1.2.5.2.2 Subunidades codificadas en el genoma nuclear

Las otras subunidades de la citocromo c oxidasa sólo están presentes en los organismos eucariotas y presentan isoformas en hongos, mamíferos y plantas.

Estas subunidades son esenciales para el ensamblado y funcionalidad de la enzima y, a diferencia de sus contrapartes codificadas en la mitocondria, presentan un menor nivel de conservación entre los diferentes organismos. En este sentido, es posible que los genes que las codifican se hayan originado luego de la colonización del huésped endosimbionte ancestral, ya que ni *Rickettsia prowazekii* ni eucariotas primitivos como *Reclinomonas americana* o *Giardia sp.* parecen presentar homólogos de estas subunidades (Das y col., 2004; Lang y col., 1997).

La complejidad evolutiva del organismo en estudio está directamente relacionada con el número de subunidades del complejo enzimático. *Dictyostelium discoideum* es uno de los pocos organismos eucariotas inferiores que se ha analizado y posee cuatro subunidades codificadas en el genoma nuclear. La de menor tamaño presenta dos isoformas cuya expresión está condicionada por la concentración de oxígeno ambiental, mientras que las tres de mayor tamaño son homólogas a las subunidades Cox6a, Cox5b y Cox5c de mamíferos (Rizzuto y col., 1991).

En la siguiente tabla se resumen las subunidades estructurales del complejo IV en levaduras, mamíferos y plantas. En este último caso, se detalla el código correspondiente de cada uno de los genes de *Arabidopsis thaliana*.

SUBUNIDADES ESTRUCTURALES DE COX EN DIFERENTES ORGANISMOS					
LEVADURAS		MAMÍFEROS		PLANTAS	
GEN	PROTEÍNA	GEN	PROTEÍNA	GEN	PROTEÍNA
<i>cox1</i>	Cox1p	<i>cox1</i>	Cox1	AtMg01360	Cox1
<i>cox2</i>	Cox2p	<i>cox2</i>	Cox2	AtMg00160	Cox2
<i>cox3</i>	Cox3p	<i>cox3</i>	Cox3	AtMg00730	Cox3
<i>cox5a/b</i>	Cox5p (a/b)	<i>cox4</i>	Cox4	-	-
<i>cox6</i>	Cox6p	<i>cox5a</i>	Cox5a	-	-
<i>cox4</i>	Cox4p	<i>cox5b</i>	Cox5b	At3g15640 (1) At1g80230 (2)	Cox5b
<i>cox13</i>	Cox6ap	<i>cox6a</i>	Cox6a	At4g37830	Cox6a
<i>cox12</i>	Cox6bp	<i>cox6b</i>	Cox6b	At1g22450 (1) At5g57815 (2) At4g28060 (3)	Cox6b
<i>cox9</i>	Cox7ap	<i>cox6c</i>	Cox6c	At3g22210	Cox6c
<i>cox7</i>	Cox7p	<i>cox7a</i>	Cox7a	-	-
-	-	<i>cox7b</i>	Cox7b	-	-
<i>cox8</i>	Cox8p	<i>cox7c</i>	Cox7c	-	-
-	-	<i>cox8</i>	Cox8	At2g47380 (1) At3g62400 (2) At5g61310 (3)	Cox5c
				At5g27760 At3g05550	CoxX1
				At4g00860 At1g01170	CoxX2
				At1g72020	CoxX3
				At4g21105	CoxX4
				At3g43410	CoxX5
				At2g16460	CoxX6

Tabla N°1: Resumen de las subunidades estructurales del complejo citocromo c oxidasa identificadas hasta el momento en levaduras, mamíferos y plantas.

Hasta el momento, en *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado ocho subunidades codificadas en el genoma nuclear: Cox4p, Cox5ap, Cox5bp, Cox6ap, Cox6bp, Cox7p, Cox7ap y Cox8p. La subunidad Cox5p posee dos isoformas con un 66% de homología entre ellas. El nivel de oxígeno regula la expresión de las mismas, ya que la subunidad Cox5ap se expresa en presencia de oxígeno, mientras que Cox5bp lo hace en condiciones de hipoxia. Estos cambios tendrían un efecto funcional, modulando la actividad de la holoenzima por medio de la alteración de sus propiedades cinéticas.

Sin embargo, estas isoformas no han persistido a lo largo de la evolución, ya que en mamíferos, su homóloga Cox4 está codificada por un solo gen (Taanman y Capaldi, 1993).

Estudios realizados en levaduras evidenciaron que la transcripción de la subunidad Cox6p del complejo IV es inducida fuertemente por niveles de oxígeno superiores al 45%. Sin embargo, concentraciones del mismo por encima del 60% no producían tal efecto inductor. Además, se determinó que corriente arriba de la región involucrada en la respuesta al oxígeno existía otra secuencia que participa en la respuesta a la glucosa y al hemo, denominada UAS6 (Silve y col., 1992; Wright y col., 1995).

En mamíferos, las subunidades codificadas en el genoma nuclear caracterizadas hasta el momento son: Cox4, Cox5a, Cox5b, Cox6a, Cox6b, Cox6c, Cox7a, Cox7b, Cox7c y Cox8. Algunas de estas subunidades tienen isoformas relacionadas con la expresión específica de órganos, tales como Cox6a, Cox7a y Cox8, que en la mayoría de los casos no presentan gran homología y parecen provenir de fenómenos de duplicación temprana. Estos genes nucleares generalmente carecen de elementos reguladores iniciadores de la transcripción (caja TATA), presentan varias regiones ricas en GC y están regulados por O₂ y nutrientes carbonados. Las características de la secuencia de la subunidad Cox5b, que incluye 4 residuos de cisteína, permite estimar que esta subunidad podría estar implicada en la unión del Zn²⁺ al complejo IV (Basu y Avadhani, 1991). La subunidad Cox4 es la de mayor tamaño y su función está vinculada con el transporte de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Posee su extremo N-terminal ubicado en la matriz mitocondrial y por medio de una región transmembrana se une con el extremo C-terminal. La subunidad Cox6a posee sitios de unión a ATP y regularía el flujo de electrones a través de la relación ADP/ATP. A partir de su secuencia se puede inferir que su localización sería hacia el interior de la matriz mitocondrial. La subunidad Cox6b posee sitios de unión a efectores y podría por lo tanto estar vinculada con la actividad enzimática (LaMarche y col., 1992).

Asimismo, existen proteínas cuya función está vinculada a la biosíntesis y ensamblado del núcleo enzimático de la citocromo c oxidasa. Tal es el caso de Cox15, que participa en el ensamblado del complejo IV (Glerum y col., 1997). En *Schizosaccharomyces pombe* Cox15 se asocia a una proteína de hierro-azufre llamada ferredoxina. La síntesis de ambas proteínas se produce en forma concertada en el interior de la mitocondria (Barros, 2001). En levaduras, se determinó además que el extremo C-terminal de la proteína Pet100 es esencial para el ensamblaje del núcleo enzimático del complejo IV (Forsha y col., 2001).

En *Saccharomyces cerevisiae*, Cox18 es una proteína transmembrana que participa en la síntesis y ensamblado de Cox2 (Lopes Souza y col., 2002). Cox20 cumple una función similar: es una chaperona de la membrana interna mitocondrial involucrada en la maduración e integración de Cox2, hasta que finaliza el ensamblado de la holoenzima (Hell y col., 2000). OXA1 es otra proteína que participa en el ensamblado de las subunidades mitocondriales, constituyendo una chaperona que facilita el anclaje del dominio N-terminal de las mismas y regulando su expresión a nivel postraducciona (Bonney y col., 1994).

En el genoma nuclear, además, están codificadas proteínas que participan en la biosíntesis del grupo hemo *a* de los citocromos *a* y *a3* y en la homeostasis del cobre mitocondrial. Tal es el caso de Cox10 y Cox15, que participan en la síntesis de hemo en la membrana interna mitocondrial, de manera tal que esté disponible durante el ensamblado de la citocromo c oxidasa (Nobrega y col., 1990; Fiori y col., 2000).

En levaduras se han descrito un conjunto de proteínas conocidas como chaperonas de cobre, implicadas en el transporte de cobre a la mitocondria y la incorporación del mismo al complejo IV (Nobrega y col., 2002). Estas proteínas son Cox17, CTR1, SCO1, Cox19 y Cox11. Cox17 es una proteína rica en cisteína, localizada tanto en el citoplasma como en el espacio intermembrana y que participa de la vía de liberación de cobre en la mitocondria para el ensamblado de la citocromo c oxidasa. CTR1 está ubicada en la membrana citoplasmática y transporta, a expensas de ATP, el cobre al interior de la célula. SCO1 es una proteína ubicada en la membrana

mitocondrial interna y resulta fundamental en el ensamblado del complejo IV (Smits y col., 1994). En cuanto a Cox19, es una proteína ubicada tanto en el espacio intermembrana como en el citoplasma celular y podría estar involucrada en el transporte de metales, interviniendo en el ensamblado del complejo citocromo c oxidasa a nivel postraduccional (Nobrega y col., 2002). Se ha demostrado que Cox11 actuaría como una metalochaperona, participando en el mecanismo de transferencia de iones cobre al sitio Cu_B de la subunidad Cox1 (Carr y col., 2002).

Cox16, en *Saccharomyces cerevisiae*, es una proteína ubicada en la membrana mitocondrial interna con el extremo C-terminal hacia el espacio intermembrana. Su función hasta el momento es desconocida (Carlson y col., 2003).

En levaduras, el conocimiento acerca de la función de aquellas proteínas involucradas en la biogénesis del complejo IV es mayor que en plantas y mamíferos. En la siguiente tabla se las resume junto con una breve descripción de cada una de ellas.

Proteínas asociadas a la biogénesis del complejo IV en levaduras	
Proteína(s)	Descripción
Pet309p	Activador de la traducción del mensajero de <i>cox1</i>
Pet111p	Activador de la traducción del mensajero de <i>cox2</i>
Pet54p, Pet122p y Pet494p	Activadores de la traducción del mensajero de <i>cox3</i>
Mss51p	Involucrada en la traducción e inserción de Cox1p
Cox14p	Requerida para la expresión y ensamblado de Cox1p
Coa1p y Coa2p	Requeridas para el ensamblado de Cox1p
Pet117p y Pet191p	Requeridas para el ensamblado de COX. Aun se desconoce su rol en forma precisa
Oxa1p	Translocasa de la membrana interna que media la inserción de las subunidades de COX codificadas en la mitocondria
Mba1p	Involucrada en la translocación de las subunidades de COX codificadas en la mitocondria
Cox18p	Requerida para la translocación del dominio C-terminal del precursor de Cox2p
Pnt1p y Mss2p	Requeridas para la translocación del precursor de Cox2p
Cox10p	Farnesiltransferasa. Cataliza el primer paso de la biosíntesis del hemo <i>a</i>
Cox15p	Hemo <i>a</i> sintasa. Cataliza el segundo paso de la biosíntesis del hemo <i>a</i>
Yah1p	Ferredoxina. Requerida para la biosíntesis del hemo <i>a</i>
Arh1p	Ferredoxina reductasa. Requerida para la biosíntesis del hemo <i>a</i>
Shy1p	Facilita la inserción del hemo <i>a</i> dentro de Cox1p
Cox17p	Metalochaperona. Involucrada en la transferencia de cobre a COX
Cox19p	Metalochaperona. Requerida para el ensamblado de COX
Cox23p	Requerida para el ensamblado de COX. Podría estar involucrada en el metabolismo del cobre mitocondrial
Sco1p	Metalochaperona. Provee el cobre a Cox2p
Sco2p	Similar a Sco1p. Puede tener una función redundante
Cox11p	Metalochaperona. Provee cobre a Cox1p
Mia40p	Proteína esencial de unión a metales en el espacio intermembrana (EIM). Involucrada en el transporte y ensamblado de proteínas del EIM
Cmc1p	Proteína relacionada con la expresión de COX y Sod1p mitocondrial

Tabla N°2: Breve descripción de las proteínas involucradas en la biogénesis del complejo IV mitocondrial en levaduras.

1.2.5.2.3 Subunidades de COX codificadas en el genoma nuclear de plantas

En plantas, las subunidades de la citocromo c oxidasa codificadas en el genoma nuclear que han sido caracterizadas hasta el momento son: Cox5b, Cox5c, Cox6a y Cox6b. En *Arabidopsis thaliana*, se encontró que el gen que codifica la subunidad

Cox5b se expresa en todos los órganos analizados y es regulado por azúcares metabolizables y amonio (Welchen y col., 2002). En semillas de esta planta, se observó además que los niveles basales de ARNm de *AtCOX5b* aumentan 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). La subunidad Cox5c es la más pequeña del complejo IV de plantas. Estudios realizados en *Helianthus annuus* evidenciaron un incremento significativo de la expresión de esta subunidad en raíz y hojas en presencia de distintas fuentes de nitrógeno, mientras que no se observaron cambios considerables en presencia de azúcares y luz. Asimismo, los niveles de transcripto se redujeron severamente al incubar las plantas en condiciones de hipoxia, pero recuperaron los niveles iniciales cuando se restauraron las condiciones normóxicas (Curi y col., 2002). De igual manera, existen rasgos compartidos por algunos de los genes que codifican subunidades del complejo IV de *Arabidopsis* y el gen que codifica al citocromo c de dicha planta. Una de estas características comunes es la respuesta ante sacarosa o luz (Ohtsu y col., 2001; Welchen y col., 2002; Figueroa y col., 2002; Curi y col., 2003; Welchen y col., 2004; Comelli y col., 2009). Otra particularidad que los agrupa es la presencia de un elemento ubicado en una posición bastante conservada en las regiones promotoras de estos genes, conocido como *site II*. Este motivo posee la secuencia 5'-TGGGCC/T-3' y la presencia del mismo en varios genes de la cadena respiratoria mitocondrial sugeriría una posible coordinación transcripcional de los mismos (Welchen y González, 2005; Welchen y González, 2006). Más aun, el análisis funcional de estos elementos demostró que los mismos son esenciales para la expresión de uno de los genes que codifica la oxidasa alternativa (AOX1c) (Ho y col., 2007), uno de los genes de citocromo c (*cytc-1*) y genes que codifican subunidades del complejo citocromo c oxidasa (Welchen y Gonzalez, 2005; Comelli y Gonzalez, 2009).

En *A. thaliana*, además, se realizaron estudios con el gen *AtCOX17*, que codifica una proteína de secuencia similar a Cox17 de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta proteína participaría en el transporte de cobre hacia la mitocondria presentando una estructura similar, en cuanto a la disposición de los grupos cisteína, a la descrita en levaduras. La expresión de Cox17 es inducida por factores tales como tratamiento con ácido salicílico,

elevadas concentraciones de cobre en el medio, inoculación bacteriana y tratamiento con óxido nítrico y peróxido de hidrógeno (Balandin y Castresana, 2002). Más tarde, se encontró que existen dos genes que codifican a AtCox17, posiblemente generados a partir de una duplicación reciente. Estudios realizados empleando sus regiones promotoras revelaron un patrón de expresión común entre ellos en raíces jóvenes y anteras, como así también una respuesta similar al daño tisular, tratamiento con bacterias patógenas y estrés oxidativo (Attallah y col., 2007-a). Un similar patrón de expresión y comportamiento frente a factores bióticos y abióticos se observó a partir del análisis realizado con los dos genes que codifican la proteína AtCox19. Uno de estos genes (*AtCOX19-1*) puede dar lugar, por *splicing* alternativo, a dos transcritos que difieren en su extremo N-terminal. Si bien ambas isoformas son importadas a la mitocondria y ancladas a la membrana interna, sólo la más pequeña fue capaz de restaurar la función de su homóloga en levaduras mutantes que carecían de esta proteína (Attallah y col., 2007-b).

Estudios en *Arabidopsis thaliana*, que involucran electroforesis bidimensional y espectrometría de masa, permitieron identificar seis subunidades desconocidas anteriormente. Estas subunidades fueron denominadas CoxX1-CoxX6 y poseen masas moleculares que se encuentran en el rango de 5-10 KDa (Millar y col., 2004). Sin embargo, la existencia de estas proteínas como elementos constituyentes de la citocromo c oxidasa debe ser confirmada, ya que podría tratarse de proteínas del complejo translocasa de la membrana externa mitocondrial (TOM) que migran conjuntamente con el complejo IV en este tipo de electroforesis. En el caso de que estos resultados sean corroborados, el complejo IV de plantas mostraría una complejidad comparable a la de levaduras (11 subunidades) y mamíferos (13 subunidades) (Millar y col., 2004).

1.2.5.3.1 Las subunidades Cox6

El gen que codifica la subunidad AtCox6a se ha podido identificar debido a que se cuenta con la secuencia completa del genoma de *Arabidopsis thaliana*. El mismo se

encuentra ubicado en el cromosoma 4 y existe en una única copia que codifica una proteína de 102 aminoácidos, con una masa molecular de 12 kDa.

En arroz se han caracterizado las subunidades Cox6b: OsCox6b-1 y OsCox6b-2. La primera está constituida por 169 aminoácidos, con una masa molecular de 19 kDa. OsCox6b-2 tiene un tamaño más pequeño, con 92 aminoácidos menos que OsCox6b-1 en el extremo N-terminal y presenta una gran homología con las subunidades Cox6b de humanos y levaduras (Ohtsu y col., 1999).

Arabidopsis thaliana posee tres genes *COX6b* denominados *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3*. La subunidad AtCox6b-1 es la de mayor tamaño, mientras que AtCox6b-2 y AtCox6b-3 presentan una gran similitud entre sí. Las subunidades Cox6b de arroz y *Arabidopsis thaliana* presentan una gran similitud en el extremo C-terminal. Esta homología también se manifiesta con las subunidades correspondientes de humanos y levaduras. Las regiones codificantes de *COX6b-1* de arroz y *Arabidopsis* están separadas por cuatro intrones, mientras que las de *COX6b-2* de arroz y *COX6b-2* y *COX6b-3* de *Arabidopsis* están separadas por tres intrones. Por medio de estudios de expresión se determinó que las subunidades Cox6b-1 de arroz y Cox6b-1 y Cox6b-3 de *Arabidopsis thaliana* se expresan en todos los órganos. En cambio, Cox6b-2 de arroz y *Arabidopsis* sólo se detectaron, con fuerte intensidad, en raíces (Ohtsu y col., 2001).

Estudios realizados en *A. thaliana* evidenciaron un significativo incremento en los niveles de ARNm de *AtCOX6a* y *AtCOX6b-1* en presencia de azúcares metabolizables y componentes nitrogenados como el amonio. Esto pone de manifiesto la existencia de un control coordinado de la expresión de estos genes codificados en el genoma nuclear (Curi y col., 2003).

1.2.5.3.2 Los genes de la subunidad Cox5c son regulados por un intrón ubicado en la región 5'UTR

Curi y colaboradores encontraron que el intrón ubicado corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de los genes que codifican la subunidad AtCox5c de *Arabidopsis thaliana* promueve elevados niveles de expresión mediante un incremento en la cantidad de transcripto y en la eficiencia de la traducción (Curi y col., 2005).

2. La expresión génica mediada por intrones (IME)

2.1 Algunos antecedentes de la expresión génica mediada por intrones

Las primeras evidencias que ponen de manifiesto la importancia de las secuencias intrónicas (en ese entonces conocidas como *secuencias intermedias*) en la expresión génica, fueron encontradas en 1979 por Hamer y Leder. Los autores dilucidaron que el proceso de remoción de las mismas, conocido como *splicing*, era un requisito para la formación de un ARN mensajero estable. Un año más tarde, Nishioka y colaboradores mostraron que los dos intrones presentes en el gen que codifica la proteína globina α -3 de ratón eran esenciales para la expresión del mismo (Nishioka y col., 1980). En este mismo organismo, el gen que codifica la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) poseería un mecanismo similar de regulación génica (Gasser y col., 1982).

2.2 Mecanismos involucrados en el incremento de la expresión génica mediada por intrones

El aumento de la expresión génica mediada por intrones puede producirse a distintos niveles. Existen intrones que contienen elementos *enhancer* capaces de incrementar los niveles de transcripto (Oshima y col., 1990; Schultz y col., 1991), y se han reportado casos en los cuales la regulación se produce a nivel post-transcripcional, a través de mecanismos dependientes del proceso de *splicing*. Estos mecanismos

conducen a una mayor eficiencia en la poliadenilación, en la estabilidad del ARNm o en el transporte del transcripto a través del complejo del poro nuclear al citoplasma (Buchman y Berg, 1988; Huang y Gorman, 1990). Se ha encontrado, además, que la región 5' UTR (por sus siglas en inglés: *Untranslated region*, también llamada región líder) de ciertos genes posee elementos capaces de incrementar la eficiencia traduccional sin alterar el patrón de expresión conferido por el promotor que los antecede. Tal es el caso de la región líder de un gen que codifica la subunidad D del Fotosistema I (*psaDb*) de *Nicotiana sylvestris*. Al realizar construcciones quiméricas que contenían el promotor 35SCaMV seguido de un fragmento de 35 pb correspondiente a la región 5' no codificante completa del mencionado gen, se observó un aumento a nivel traduccional de unas 20 veces con respecto a la construcción que no poseía el fragmento analizado (Yamamoto y col., 1995). El estudio detallado de dicha secuencia permitió identificar dos motivos esenciales involucrados en el efecto observado. Estos elementos, denominados LM1 (TCTCAA) y LM2 (CAACTTT), están presentes además en la región 5' UTR del gen que codifica la proteína ferredoxina (*fedA*) de *Arabidopsis*, que en experimentos de expresión transiente mostró un aumento en la eficiencia traduccional de unas 25 veces (Caspar y Quail, 1993).

En plantas, el fenómeno de “estimulación” de la expresión génica mediado por intrones fue reportado recién en 1987 por Callis y colaboradores. En este caso, se encontró que la presencia de los intrones en el gen que codifica la enzima alcohol deshidrogenasa 1 (*Adh1*) de maíz era esencial para la expresión del mencionado gen. Sin embargo, se descubrió también que no todos los intrones debían estar presentes para que el gen se exprese convenientemente. Más aun, por medio de construcciones quiméricas se determinó que el primer intrón de *adh1* era capaz de incrementar los niveles de expresión de otros genes de maíz cuando era insertado entre el promotor y la región codificante de los mismos. El efecto producido, en este sentido, era predominantemente a través de un aumento en los niveles de ARN mensajero pero no a nivel traduccional (Callis y col., 1987).

En arroz, se caracterizó un fragmento de 1300 pb ubicado corriente arriba del sitio de inicio de la traducción del gen *act1*. El mismo posee un intrón en la región 5' no

codificante. Al realizar fusiones de este fragmento al gen reportero *gus* se pudo observar que el mismo se expresaba eficientemente. Sin embargo, al remover el mencionado intrón no se detectó actividad enzimática GUS. Al ubicar dicha secuencia intrónica en diferentes posiciones se pudo demostrar que la misma carecía de posibles elementos *enhancer*, algo similar a lo observado previamente en el gen *adh1* de la misma planta (McElroy y col., 1990). Un estudio similar se realizó con el gen que codifica la proteína Ubiquitina 1 de maíz (*ubi-1*). A través de la fusión al gen reportero CAT (cloranfenicol acetil transferasa) de un fragmento compuesto por 900 pb ubicado corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, unido a la región 5' no codificante completa (la cual presenta un intrón en su secuencia) del gen *ubi-1*, se observó que los niveles de actividad CAT alcanzados eran diez veces superiores a los obtenidos al emplear la región promotora del gen del virus del mosaico de la coliflor 35SCaMV (Christensen y col., 1992).

En los casos en que los intrones carecen de elementos *enhancers* transcripcionales, el mecanismo primario de “estimulación” de la expresión génica dependería principalmente del proceso de *splicing* y de factores críticos que involucran la estructura y la posición del intrón en el gen analizado (Callis y col., 1987; Luehrsen y Walbot, 1991).

La importancia del primer intrón en el gen *adh1*, descrita previamente, también fue observada en el gen *tpi* que codifica la enzima Triosafosfato isomerasa de arroz. En este caso, se observó que dicha secuencia era esencial para la expresión del gen reportero *gus* en arroz, cebada y maíz, pero no en tabaco, tomate ni soja. Esto pone de manifiesto diferencias en los mecanismos de expresión génica en monocotiledóneas y dicotiledóneas (Xu y col., 1994). Por otra parte, podría sugerir que el proceso de *splicing* sería un requerimiento más estricto en plantas monocotiledóneas, debido a que se han observado numerosos casos en los que altos niveles de expresión fueron logrados en plantas dicotiledóneas transformadas con construcciones carentes de intrones (Sijmons y col., 1990; Poirer y col., 1995).

En espinaca, se encontró que el primer intrón del gen *psaD*, que codifica una proteína del Fotosistema I de dicha planta, estaba involucrado en la expresión del mismo en respuesta a distintas intensidades de luz y señales provenientes del cloroplasto (Bolle y col., 1996). Además de ciertos intrones, existen secuencias ubicadas en la región 5' UTR que revisten importancia en mediar la respuesta de algunos genes frente a diversas señales o estímulos. Este es el caso del gen *fed1* (que codifica la proteína ferredoxina I) de arveja, que presenta repeticiones del elemento CATT en esta región génica. Se ha demostrado que la mutación de uno de estos elementos conduce a una inhibición del efecto normal de la oscuridad en la asociación del transcripto al polirribosoma (Dickey y col., 1998).

Un caso en el cual los intrones fueron capaces de incrementar la expresión de un gen a nivel transcripcional fue descrito por Gidekel y col. (1996). Los autores encontraron que el primer intrón del gen *eIF1-β* de *Arabidopsis thaliana* era esencial para la expresión del mencionado gen, y que incluso era capaz de unir factores de transcripción provenientes de un extracto de proteínas nucleares de esa planta. Asimismo, el proceso en el cual esta secuencia estaría involucrada es parcialmente independiente de su orientación (directa o reversa), ya que se detectaron activaciones en ambos sentidos (aunque mayor en la primera), e independiente de su ubicación, debido a que su funcionalidad no se vio alterada cuando se la localizó fuera de la unidad transcripcional.

Un mecanismo de regulación de la expresión génica diferente al mencionado es el del gen *pat1* de *Arabidopsis thaliana*, que codifica la enzima fosforribosiltransferasa de la vía biosintética del triptófano. La fusión al gen reportero *gus* de construcciones que incluían o no los dos primeros intrones y los dos primeros exones del gen *pat1*, puso en evidencia que la tasa transcripcional en ambos casos era similar. Sin embargo, la cantidad de ARN mensajero acumulado y la actividad enzimática GUS era notoriamente superior en el primer caso. Esto eliminaría la posibilidad de un elemento *enhancer* transcripcional ubicado en esta región y evidenciaría un rol de la misma en el aumento en la estabilidad del transcripto o de su traducibilidad (Rose y Last, 1997).

Un estudio más detallado realizado con intrones de maíz mostró la importancia de la secuencia y posición de los mismos en el aumento de la expresión génica. Empleando tres intrones distintos (solos o combinados) insertados en diferentes posiciones dentro de la secuencia codificante del gen reportero *luciferasa*, se pudo demostrar que a pesar de que las cantidades de transcripto obtenidas en cada caso no diferían considerablemente, sólo una secuencia intrónica en particular, con su ubicación próxima a la región promotora, producía el efecto “estimulador” esperado. Esto sugeriría que el procesamiento nuclear del preARNm determinaría los niveles de expresión final observados, a través de la estructura de la partícula de ribonucleoproteína correspondiente (Bourdon y col., 2001). Otro estudio que resalta la importancia de la ubicación del intrón analizado fue abordado por Rose (2004). En este caso, la habilidad de los primeros intrones de los genes *trp1* y *ubq10* de *Arabidopsis* de incrementar la expresión génica fue disminuyendo gradualmente con la distancia a la región promotora. Además, el efecto estimulador proporcionado por los mismos fue mayor a nivel traduccional que en lo referente a los niveles de transcripto, sugiriendo que los mecanismos involucrados en el aumento transcripcional y post-transcripcional serían distintos (Rose, 2004).

Sin embargo, el efecto producido por ciertos intrones no se restringe al mero aumento de los niveles de expresión del gen o construcción génica que los contenga. Existen casos donde dichas secuencias son responsables de conferir un determinado patrón de expresión tejido-específico. En este sentido, se puede citar como ejemplo al intrón líder del gen *Ubi.U4* de *Nicotiana tabacum*. Fusiones al gen reportero *gus* revelaron que la remoción del mencionado intrón condujo a una pérdida de actividad GUS en tejidos maduros, sin afectar la expresión en células estresadas o en aquellas mitóticamente activas (Plesse y col., 2001).

Otro ejemplo de lo antes expuesto es el caso del gen *OsTubA1* (que codifica la proteína Tubulina α) de arroz. Este gen está formado por cuatro exones y tres intrones. Un estudio similar al mencionado anteriormente puso en evidencia que este gen se expresa fuertemente en tejidos en activa división celular, tales como meristema de la raíz, hojas jóvenes y flores. Sin embargo, al remover el primer intrón, se observó una

mayor expresión en los tejidos maduros que en los jóvenes (Jeon y col., 2000). Un comportamiento similar se observó en el gen *PhADF1* de *Petunia*, el cual requiere de la presencia de su primer intrón para poder expresarse en el tejido vascular de la planta (Mun y col., 2002). En este sentido, también se encontró que el gen que codifica la proteína S-adenosilmetionina decarboxilasa requiere de la presencia de su intrón líder para poder expresarse en flores, tallo y venas de los cotiledones (Kim y col., 2004).

Resulta evidente que no existe un único mecanismo mediante el cual determinados intrones son capaces de “estimular” la expresión génica. De hecho, la escasa conservación de secuencias que presentan es una prueba de ello. Sin embargo, a pesar de no existir un patrón común que los vincule, resulta evidente que su participación, ya sea a nivel transcripcional o post-transcripcional, es esencial en la “comunicación de la historia” del transcripto, la cual es trazada principalmente a través de las proteínas que se unen al mismo desde que es sintetizado hasta su exportación al citosol para ser traducido, involucrando procesos estrechamente relacionados.

Los intrones son capaces de afectar la eficiencia transcripcional de diferentes maneras, ya sea debido a la presencia de elementos *enhancers* o *represores* transcripcionales, o por la presencia de *motivos* de posicionamiento del nucleosoma que pueden influir en la eficiencia de la iniciación de la transcripción o debido a los factores proteicos que reclutan. En tal caso, los componentes de la maquinaria de *splicing* pueden “estimular” el proceso transcripcional a nivel de su inicio y elongación. Por otra parte, el complejo de unión al *5'cap* es capaz de promover la excisión de los intrones ubicados hacia el extremo 5' del gen, mientras que la interacción entre el *spliceosoma* y la maquinaria de poliadenilación promueve la remoción de los intrones localizados hacia el extremo 3' del mismo (figura 5). Se ha observado, además, que los intrones cumplen una función de “guías” en la alteración química de algunos nucleótidos de exones a través de la maquinaria de editado (Le Hir y col., 2003).

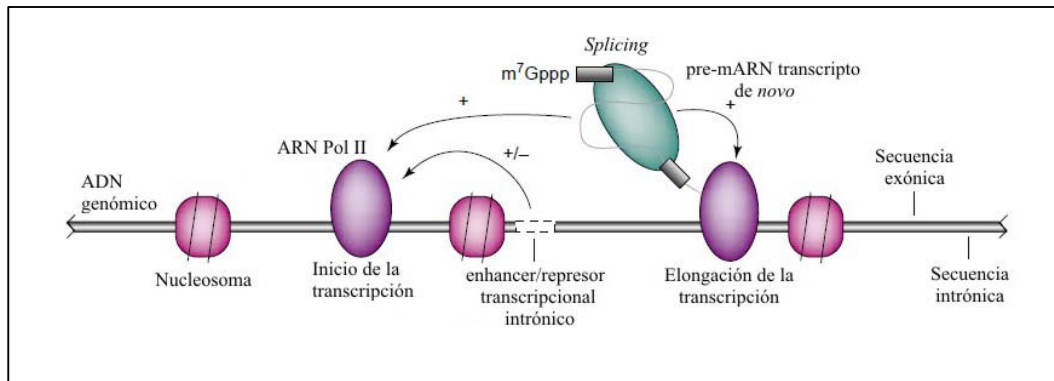


Figura 5: Representación esquemática de los posibles mecanismos de acción de las secuencias intrónicas en la expresión génica (extraído de Le Hir y col., 2003).

2.3 El complejo de la unión entre exones (EJC)

Los ARNm existen *in vivo* como partículas de ribonucleoproteínas (mRNPs, por sus siglas en inglés). La composición proteica de las mismas es de vital importancia en el metabolismo de ese ARNm, que incluye su localización subcelular, su eficiencia traduccional y su vida media. En este sentido, existen numerosos casos que muestran que el proceso de *splicing* puede alterar la estructura y composición de las mRNPs y por lo tanto afectar los procesos posteriores de su metabolismo.

Estudios realizados con extractos nucleares de células humanas (HeLa) y de *Xenopus laevis*, pusieron en evidencia que los componentes de la maquinaria de *splicing*, denominados en su conjunto *spliceosoma*, “reclutan” y “depositan” varias proteínas sobre los ARNm, formando en su conjunto un complejo de aproximadamente 335 KDa. Este complejo multiproteico protege de la digestión con ARNasa aproximadamente a 8 nucleótidos de la molécula, y se localiza en una posición muy conservada, a 20-24 nucleótidos “corriente arriba” de cada unión exón-exón. Ensayos de inmunoprecipitación permitieron identificar cinco proteínas de este complejo, denominado por su característica de unión al ARN como “COMPLEJO DE LA UNIÓN ENTRE EXONES” (en inglés *Exon Junction Complex*, EJC). Tales proteínas eran: SRm160, DEK y RNPS1, todas ellas factores asociados al *splicing*, la proteína Y14 y el factor de exportación de ARNm REF (Le Hir y col., 2000).

2.3.1 Estructura del EJC

El EJC contiene más de 20 proteínas distintas, de las cuales eIF4A-III, Y14, Mago y MLN51 forman el núcleo tetramérico (*core*), que actúa como una plataforma de anclaje de otros componentes, y son, hasta el momento, las más caracterizadas tanto estructural como funcionalmente (Ballut y col., 2005; Andersen y col., 2006). A través de ensayos de *crosslinking* con radiación UV se pudo demostrar que sólo eIF4A-III y MLN51 contactan directamente el ARN en el complejo (Ballut y col., 2005; Shibuya y col., 2004). Esto explicaría la resistencia a ARNasa A, debido a que el ARN al ser alojado de tal manera que su “esqueleto” resulta inaccesible al solvente, permitiría proteger de la digestión enzimática a 8 ó 9 nucleótidos de la molécula (Ballut y col., 2005; Le Hir y col., 2000). Asimismo, los factores proteicos Mago, Y14 y MLN51 son capaces de interactuar directamente con eIF4A-III (Palacios y col. 2004; Shibuya y col. 2004).

La reconstitución del EJC en humanos reveló que se trata de un complejo dependiente de la hidrólisis de ATP. Su asociación estable con el ARNm es mantenida por el heterodímero Mago-Y14, a través de la inhibición de la actividad ATPasa de la proteína eIF4A-III. Sin embargo, esta actividad es necesaria, inicialmente, para producir el desenrollamiento del ARN o para los posibles re-arreglos ARN-proteína. De esta manera, el montaje del EJC sobre el ARN se iniciaría a través de eIF4A-III, ensamblándose luego el resto de las proteínas que conforman el núcleo del complejo (Andersen y col., 2006). Un esquema de la estructura tridimensional del EJC asociado al ARN puede visualizarse en la figura 6.

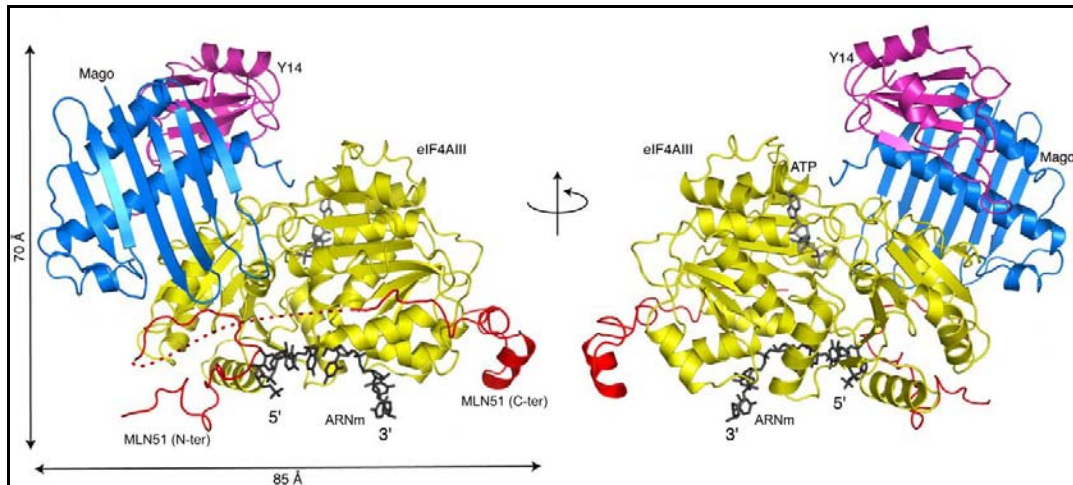


Figura 6: Estructura tridimensional del núcleo del EJC humano, en dos orientaciones relacionadas por una rotación de 180°. En amarillo, se representa la proteína eIF4A-III, contactando en forma directa la molécula de ARNm (en gris oscuro); en azul se esquematiza la proteína Mago, mientras que en rojo y púrpura se visualizan las proteínas MLN51 e Y14, respectivamente (extraído de Bono y col., 2006).

2.3.1.1 Las proteínas del núcleo del EJC

2.3.1.1.1 La proteína MLN51

MLN51 ha sido principalmente caracterizada en mamíferos (en donde se la denomina Barentsz). Exhibe una localización dendrítica en neuronas del hipocampo maduras y está implicada en la localización de ARNm (Mohr y col., 2001; van Eeden y col., 2001; Palacios 2002; Macchi y col., 2003; Hachet y Ephrussi, 2004; Palacios y col., 2004). Además, se ha sugerido un posible rol de la misma en la vía NMD (que se describe más adelante), debido a que como consecuencia de la reducción en los niveles del mensajero que la codifica, se observó que este mecanismo era afectado severamente (Ferraiuolo y col., 2004; Palacios y col., 2004; Shibuya y col., 2004). Adicionalmente, por medio de estudios de expresión empleando el gen reportero *luciferasa*, se demostró que esta proteína era capaz de “estimular” la expresión génica a nivel traduccional (Tange y col., 2005).

2.3.1.1.2 La proteína eIF4A-III

eIF4A-III es una proteína con actividad helicasa y miembro de la familia de proteínas con motivo DEAD (*DEAD box*) constituido por los residuos Asp-Glu-Ala-Asp. Estas proteínas están generalmente implicadas en un gran número de procesos celulares tales como inicio de la traducción, alteración de la estructura secundaria del ARN, *splicing* nuclear y mitocondrial y en el ensamblaje de ribosomas y *spliceosomas*. Su secuencia primaria es altamente similar a la de los factores de iniciación eIF4A-I y eIF4A-II, que también pertenecen a la mencionada familia (Li y col., 1999; Chia y col., 2004). A su vez, su secuencia está conservada entre animales y plantas, con un 74% de identidad entre ellas. Sin embargo, en *Arabidopsis* esta proteína presenta un dominio DESD (Asp-Glu-Ser-Asp), en las posiciones 184 a 187, involucrado en la hidrólisis de ATP y en el acoplamiento de este proceso con la actividad helicasa. Presenta además una región de unión a ATP (comprendida entre los residuos 82 a 86), un dominio SAT (entre los aminoácidos 215 a 217), esencial para el desenrollamiento del ARN, y un cuarto dominio (aminoácidos 360 a 367), exclusivo de las ARN helicasas, e involucrado en la unión al ARN de una manera dependiente de la hidrólisis de ATP (Li y col., 1999). Asimismo, su región C terminal es la más conservada entre especies, y contiene los residuos involucrados en la unión al ARN antes mencionada y en la interacción con Mago, Y14 y el dominio *Sel* de MLN51 (Andersen y col., 2006). Con respecto a su localización celular, se la ha identificado compartiendo ubicación con otros componentes del EJC, tales como Mago, Y14 y MLN51. Sin embargo, eIF4A-III es altamente dinámica y ha sido detectada en el nucleoplasma durante condiciones de crecimiento normal, y en el nucleolo en condiciones de hipoxia (Koroleva y col., 2009).

2.3.1.1.3 La proteína Mago

La secuencia primaria de la proteína Mago presenta una elevada conservación desde humanos hasta *S. pombe*. El análisis cristalográfico de esta proteína en humanos reveló que está constituida por una lámina β de 6 cadenas antiparalelas empaquetadas de una manera inusual contra dos hélices α antiparalelas, y una tercera pequeña hélice

α . La lámina β es atípica debido a que casi no presenta torsión, y las cadenas individuales se encuentran no curvadas. Estas características permiten que la superficie de esta lámina sea plana y extendida. Como consecuencia de esto, la lámina β no envuelve el sub-dominio helicoidal como ocurre comúnmente en los dominios α/β pequeños, haciendo que la estructura de Mago sea única en este sentido. Esto podría explicar la alta conservación de secuencia de esta proteína en distintos organismos (Lau y col., 2003).

2.3.1.1.3 La proteína Y14

Y14 ha sido descrita como una proteína de unión a ARN. Está constituida por una lámina β de cuatro cadenas antiparalelas y dos hélices α . A pesar de no presentar la elevada conservación observada en los ortólogos de Mago, los niveles de identidad de secuencia del dominio de unión a ARN (RBD, por sus siglas en inglés), alojado entre los aminoácidos 72 y 149, son bastante elevados. De hecho, los “motivos” característicos de RBDs, denominados en este caso RNP1 y RNP2, están altamente conservados en los ortólogos de Y14 y muestran alto grado de identidad con las secuencias consenso de los módulos de unión a ARN previamente caracterizados en otras proteínas. Sin embargo, la superficie de unión al ARN en Y14 queda completamente ocluida por la “cara helicoidal” de Mago cuando se forma el complejo. El heterodímero formado es extremadamente estable y los aminoácidos comprometidos en esta interacción están altamente conservados en ambas proteínas. (Lau y col., 2003). En *Drosophila melanogaster*, ensayos de movilidad en geles de retardo sugirieron que el heterodímero purificado no era capaz de unir ARN. Sin embargo, se pudo detectar una débil actividad de unión individual con Y14 aislada (Shi y Xu, 2003).

2.3.2 Proteínas accesorias y funciones asociadas al EJC

En eucariotas superiores, el EJC está íntegramente involucrado en la biogénesis de ARN mensajeros. Se deposita sobre ellos como consecuencia del proceso de *splicing*

y determina varios eventos de su metabolismo. El transporte y la localización subcelular de ciertos ARN mensajeros, el aumento de la estabilidad y traducibilidad de los mismos y el proceso de “vigilancia y degradación” de ARN mensajeros truncos son algunas de las funciones más importantes del EJC.

En *Drosophila*, la localización correcta del ARN mensajero *oskar* en el polo posterior es esencial para la línea germinal y para la formación del abdomen del futuro embrión (Hachet y Ephrussi, 2001; Mohr y col. 2001; Newmark y Boswell, 1994). En este sentido, las proteínas Y14 y Mago son requeridas en este proceso y co-localizan junto con el mencionado mensajero en el polo posterior del oocito, siendo crucial el proceso de remoción del primer intrón para que este evento ocurra exitosamente (Hachet y Ephrussi, 2004).

El rol del EJC en la exportación de mensajeros es llevado a cabo a través de las proteínas de la familia REF. Estas contienen un dominio de unión a ARN flanqueado por regiones ricas en Arg-Gly de longitud variable. Los miembros de esta familia pueden unir ARN en forma directa y a su vez al factor de exportación de ARNm TAP/Mex67 (Le Hir y col., 2000). Estudios realizados en *Xenopus laevis* revelaron que las proteínas REF juegan un rol fundamental en la exportación de mensajeros, actuando una vez producido el proceso de *splicing*, pero antes de su unión a TAP/Mex67. Sin embargo, los autores pudieron demostrar que el proceso de exportación podría ser, en algunos casos, independiente del *splicing*, pero influenciado por la secuencia del ARNm o por la disponibilidad de las proteínas REF (Rodrigues y col., 2001).

La proteína SRm160 participa como un co-activador del *splicing* y a su vez en la formación del extremo 3' del ARN mensajero (Blencowe y col., 1998; Blencowe y col., 2000). Al incrementar los niveles de esta proteína, se promueve el procesamiento del extremo 3' de los transcritos tanto *in vivo* como *in vitro*. Extraordinariamente, *in vivo*, elevados niveles de SRm160 condujeron a una inhibición del *splicing* y a una acumulación de pre-ARNm en el citoplasma. Esto podría deberse a que los transcritos que no atraviesan el proceso de *splicing* pueden ser procesados en su extremo 3' y exportados al citosol en estas condiciones. Es evidente entonces la importancia de los

niveles de SRm160 en la coordinación de los eventos de procesamiento de estos ARNm (McCracken y col., 2002).

Además de las REF, existen otras proteínas accesorias del EJC involucradas en la exportación de ARN mensajeros. Entre ellas, se encuentra UAP56, que ha sido descrita como miembro de la familia de proteínas con dominio DExD/H, presuntamente con actividad helicasa dependiente de ATP (De la Cruz y col., 1999). UAP56 es requerida durante el proceso de *splicing* (Fleckner y col., 1997; Libri y col., 2001) y se une a REF/Aly durante el ensamblado del EJC (Jensen y col., 2001). Al igual que lo descrito anteriormente para las proteínas REF, los niveles de UAP56 son esenciales para la exportación de ARNm. Estudios realizados en *C. elegans* revelaron que bajos niveles de UAP56 conducían a una fuerte supresión de un gen de abundante expresión en el intestino del organismo. Asimismo, la sobre-expresión de la misma produjo un efecto similar pero más severo, observándose letalidad en todos los estadios del desarrollo (McMorris y col., 2003).

La proteína RNP51 ha sido definida como un activador del proceso de *splicing*, capaz de actuar en forma sinérgica con proteínas de tipo SR (denominadas de esta manera debido a su riqueza en dipéptidos arginina-serina). Es un polipéptido de aproximadamente 50 KDa y presenta en su estructura dos dominios de unión a ARN (denominados RNP-1 y RNP-2), un dominio rico en residuos de serina (dominio S), una señal de localización nuclear (NLS) y un decapeptido bastante conservado entre especies. Su localización sub-celular es predominantemente nuclear (Mayeda y col., 1999).

Existe una vasta evidencia que demuestra que el proceso de *splicing* está involucrado en un aumento de la transcripción de ARN mensajeros y su procesamiento en el extremo 3', como así también en un incremento de los niveles de transcripto tanto en el núcleo como en el citoplasma. Asimismo, es capaz de promover la exportación nuclear y "estimular" la traducción (Buchman y Berg, 1988; Lyu y Mertz, 1989; Luo y Reed, 1999; Lu y Cullen, 2003; Nott y col., 2003). Desde el descubrimiento del EJC, se hicieron numerosos intentos por dilucidar si el proceso de remoción de intrones es el

responsable del efecto observado, o bien se debe a la acción directa de uno o más componentes del EJC unidos al mensajero como consecuencia del *splicing*. En este sentido, estudios realizados en células humanas revelaron que el proceso de *splicing* era incapaz de “estimular” la expresión génica si no se producía la formación del EJC sobre los mensajeros analizados. Sin embargo, los autores encontraron que ciertos componentes del complejo, SRm160 y RNPS1 por ejemplo, son capaces de incrementar la expresión de ARN mensajeros sin intrones, pero no la de sus análogos con estas secuencias. Este efecto era conseguido a través de un procesamiento “facilitado” del extremo 3’ y una “estimulación” a nivel traduccional, sin alterar la exportación nuclear. Estos resultados sugerirían que el rol del *splicing* en la expresión génica sería parcial o debido preferentemente a la acción de los componentes del EJC (Wiegand y col., 2003).

El incremento de la expresión génica observado a nivel traduccional mediado por el EJC fue estudiado detalladamente por Lee y colaboradores. Los autores analizaron el efecto de distintos componentes del complejo y encontraron que el factor de iniciación de la traducción eIF4A-III era capaz de “estimular” la traducción luego de la formación del complejo ribosomal 80S. Además, demostraron que Y14, probablemente a través de su unión a la proteína Pym, que a su vez facilita el ensamblaje del ribosoma al transcripto (Diem y col., 2007), aumenta la traducción de mensajeros antes de la formación del complejo 80S. Estos resultados sugieren que el rol del EJC a nivel traduccional se llevaría a cabo en múltiples etapas de este proceso (Lee y col., 2009).

Posibles funciones adicionales del EJC han sido propuestas a medida que se identificaron nuevos factores constituyentes del mismo. Este es el caso de las proteínas Acinus y SAP18. Acinus fue inicialmente descrita como una proteína que, una vez producido el clivaje proteolítico por las caspasas, es capaz de inducir apoptosis y la condensación de la cromatina en células pre-apoptóticas (Sahara y col., 1999). Esta proteína se expresa en tres isoformas: AcinusL, AcinusS y AcinusS’. Las dos últimas se identificaron en células HeLa, asociadas con RNPS1 y con SAP18 (Zhang y col., 1997), formando un complejo heterotrimérico estable denominado ASAP (por las siglas en inglés *Apoptosis and Splicing Associated Proteins*) (Schwerk y col., 2003). Cabe

destacar que SAP18 es una proteína que ha sido ubicada tanto en núcleo como en citosol, mientras que Acinus presenta una localización exclusivamente nuclear (Tange y col., 2005). En la figura 6 se muestra un esquema del EJC humano, detallando las proteínas involucradas en la formación de su “núcleo”, como así también aquellas vinculadas al mismo en forma “permanente” o “transitoria”.

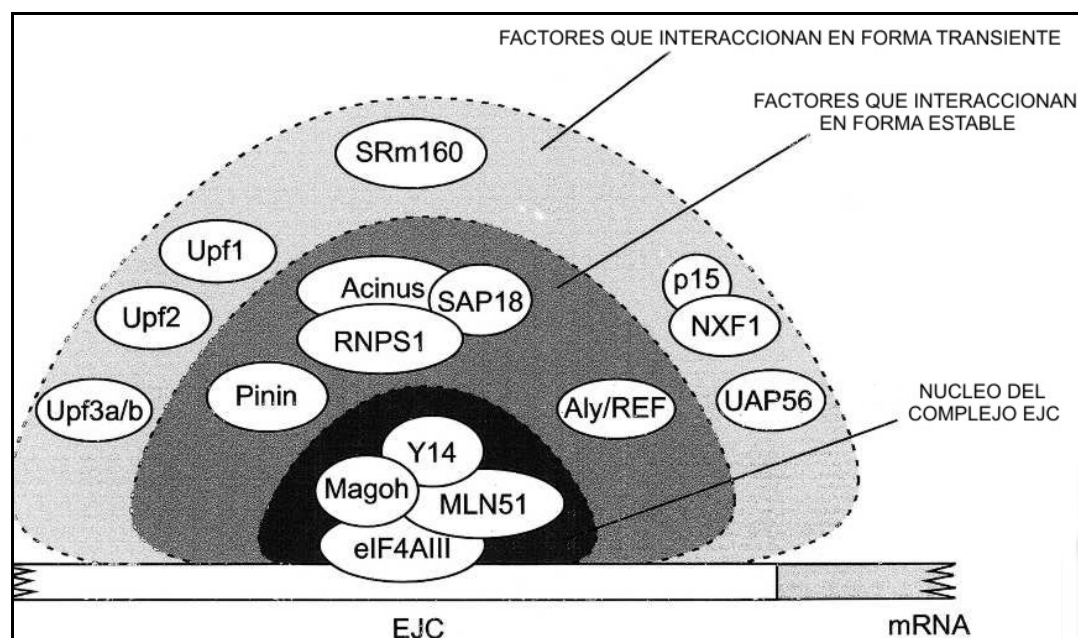


Figura 6: Representación esquemática del EJC en humanos. Los componentes se muestran agrupados en tres “esferas”. Se destacan las proteínas que conforman el núcleo en contacto con el ARNm en una posición conservada con respecto a la unión exón-exón. Asimismo, se detallan aquellos factores proteicos que se unen al *core* en forma estable y transitoria, en relación a la función que el complejo desarrolla (extraído de Tange y col., 2005).

2.3.2.1 Relación del EJC con la vía de vigilancia y degradación de ARNm (NMD)

El proceso de “NMD” (por sus siglas en inglés, *nonsense-mediated mRNA decay*) es una vía de vigilancia de ARN mensajeros, que “identifica” aquellos transcritos que poseen codones de terminación prematuros y los conduce a su degradación (Ibba y Soll, 1999; Maquat y Carmichael, 2001; Orphanides y Reinberg, 2002; Reed, 2003; Baker y Parker, 2004). La importancia de este mecanismo radica en

que la traducción de estos ARNm conduciría a la producción de proteínas truncas, potencialmente tóxicas para la célula, o bien a un consumo de energía innecesario. Los codones de terminación prematuros se pueden originar de varias maneras. Las más comunes son: las mutaciones aleatorias en el ADN que luego se transmiten al mensajero durante la transcripción, los errores en el proceso de *splicing*, incluyendo el *splicing* alternativo aberrante (Maquat, 2004; Lejeune y Maquat, 2005; Culbertson, 1999; Frischmeyer y Dietz, 1999) y los rearrreglos programados del genoma. En mamíferos, el ejemplo más estudiado en este sentido es el del receptor de linfocitos T (TCR) y los genes que codifican inmunoglobulinas (Igs), que atraviesan rearrreglos programados del ADN con el fin de aumentar el repertorio de receptores antigénicos. Dos de tres veces, estos rearrreglos conducen a mutaciones en el ADN y consecuentemente a la formación de codones de terminación prematuros, lo que activaría la respuesta NMD (Li y Wilkinson, 1998).

El mecanismo de NMD se encuentra altamente conservado en varios organismos eucariotas (Culbertson, 1999). El núcleo del complejo involucrado comprende tres factores proteicos, denominados UPFs (por las siglas en inglés, *up-frameshift*), que fueron inicialmente descubiertos en *Saccharomyces cerevisiae* y posteriormente en eucariotas superiores (Leeds y col., 1992; Cui y col., 1995; Lee y Culbertson, 1995). Una de estas proteínas, UPF1, es un miembro de la familia de helicasas de grupo I y es reclutada al ARNm una vez realizado el reconocimiento del codón prematuro por la maquinaria traduccional (Czapinski y col., 1998; Kashima y col., 2006). La rápida degradación del ARNm es desencadenada cuando UPF1 interacciona con otras dos proteínas UPF: UPF2 y UPF3, por medio de un mecanismo poco conocido. En mamíferos y plantas, UPF2 y UPF3 forman parte además del EJC. Asimismo, el núcleo tetramérico de este complejo (eIF4AIII, MLN51 y el heterodímero Mago/Y14) también participa en la respuesta NMD (Chang y col., 2007). En *Drosophila*, sin embargo, el EJC no participa en el mecanismo de NMD. Genes que carecen de intrones pero contienen codones de terminación prematuros son comúnmente degradados por esta vía. Asimismo, en *Saccharomyces cerevisiae* el EJC está ausente, y un determinado elemento ubicado hacia el extremo 3' (DSE, por sus siglas en inglés, *downstream*

sequence element), o una región 3' UTR anormalmente larga, son los responsables de desencadenar una respuesta NMD (Gonzalez y col., 2001).

2.3.3 El desensamblaje del EJC del ARNm. Posible función de la proteína Pym

Teniendo en cuenta que la abundancia de las proteínas que conforman el núcleo del EJC (eIF4A-III, Mago, Y14 y MLN51) es limitada, y el número de uniones exón-exón en el transcriptoma en estado estacionario es elevada, es necesario que el complejo sea eficientemente removido del transcripto y “reciclado”. De esta manera se lograría una eficiente traducción y se aseguraría que el resto de los mensajeros cuenten con el número “apropiado” de complejos (Gehring y col., 2009). Inicialmente, los modelos propuestos apuntaban a que los EJC eran removidos en el citoplasma como consecuencia de la primera ronda traduccional, si los mismos estaban ubicados dentro del marco abierto de lectura (Dostie y Dreyfuss, 2002; Lejeune y col., 2002).

Pym fue en un comienzo identificada como una proteína que interactuaba con el heterodímero Mago-Y14, empleando para tal fin su extremo N terminal (Bono y col., 2004). Más tarde, se demostró que era capaz de unirse a los ribosomas y co-sedimentar con la subunidad ribosomal 40S en centrifugaciones en gradiente de sacarosa (Diem y col., 2007). De esta manera, Pym fue propuesta originalmente como una “molécula puente” entre el EJC y el ribosoma capaz de mediar la “estimulación” traduccional de los transcriptos unidos al EJC (Diem y col., 2007). Recientemente, Gehring y col. demostraron que Pym operaría como un “factor de desensamblaje” del EJC. Mediante ensayos de *splicing in vitro*, encontraron que esta proteína es capaz de unirse a los EJC completamente ensamblados (no así a los complejos parcialmente formados) y desestabilizar su unión al transcripto. Asimismo, versiones “mutantes” de Pym que no son capaces de interactuar con el heterodímero Mago-Y14 eran incapaces de producir este efecto desestabilizador (Gehring y col., 2009). Un modelo propuesto del proceso de desensamblaje del EJC es ilustrado en la figura 7.

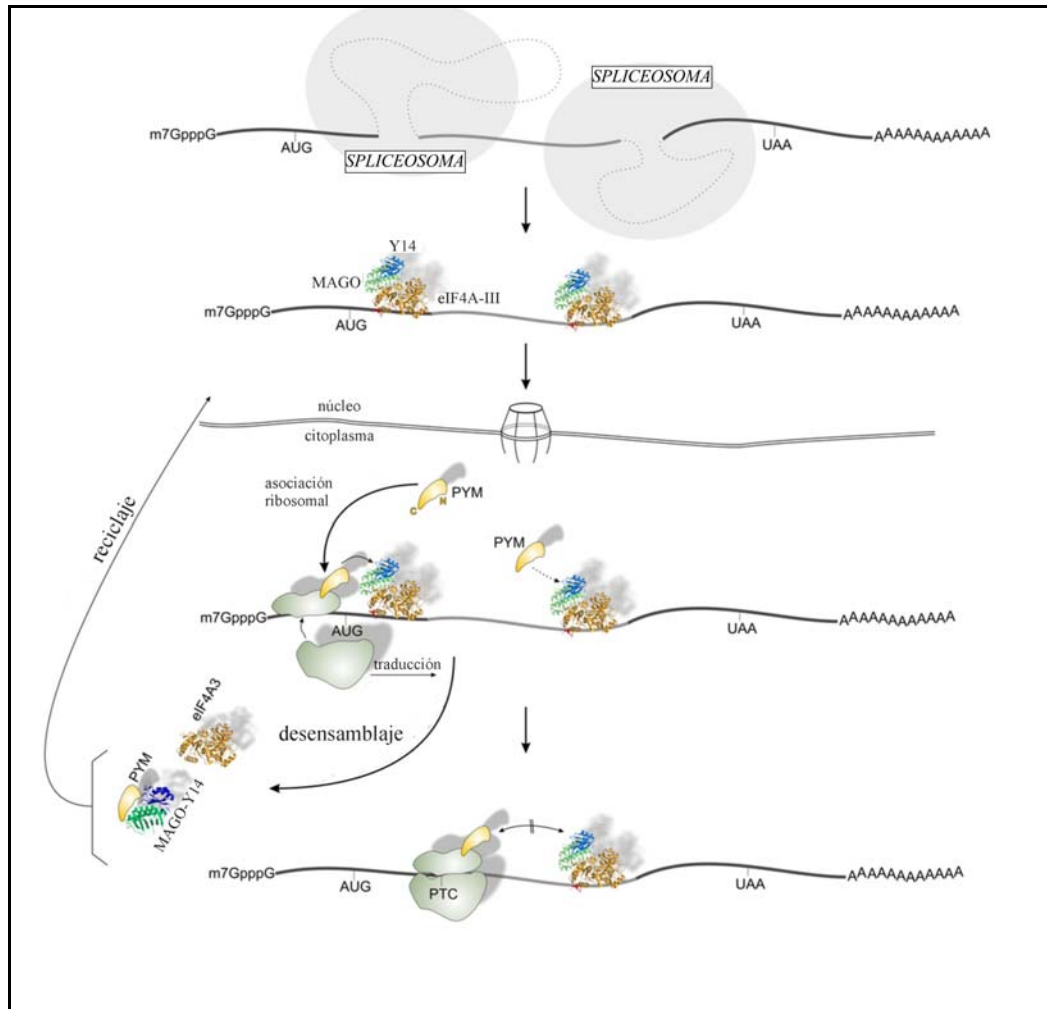


Figura 7: Esquema que detalla el mecanismo de unión del EJC al ARNm y el posible rol de la proteína Pym en desestabilizar este vínculo. El EJC es ensamblado en el núcleo durante el proceso de *splicing*. La proteína Pym (en amarillo) interacciona por medio de su extremo C terminal con la subunidad menor del ribosoma y remueve los EJC durante el tránsito ribosomal, empleando su extremo N terminal en la interacción con el heterodímero Mago-Y14. Luego, los componentes del complejo son “reciclados” y transportados nuevamente al núcleo. Debido a la gran afinidad de unión de Pym con el ribosoma, se consigue que la misma se encuentre en muy baja cantidad en forma “libre” en el citosol, y de esta manera se evita un posible desensamblado independiente de la traducción (extraído de Gehring y col., 2009).

2.3.4 El EJC de plantas

Como se mencionó anteriormente, la proteína Mago presenta una elevada conservación entre especies. Más aun, el ortólogo de *Arabidopsis* muestra una identidad en su secuencia primaria superior al 75% comparado con su par de *Drosophila* (Swidzinski y col., 2001). Además, las proteínas Y14, eIF4A-III y otros componentes del EJC también han sido identificados en esta planta (Pendle y col., 2005). El rol del EJC en plantas ha sido poco estudiado y de hecho su participación en la vía NMD es aún cuestionada. De una manera similar a lo observado en *S. cerevisiae* y *Drosophila*, los ARNm carentes de intrones pueden “disparar” este mecanismo, sugiriendo que el EJC no sería requerido en células vegetales (Jofuku y col., 1989; Voelker y col., 1990; Dickey y col., 1994; van Hoof y Green, 1996; Petracek y col., 2000).

Debido a la función establecida de los componentes del EJC en otros eventos relacionados con el metabolismo del ARNm, tales como localización y control traduccional, resulta razonable que sus ortólogos de plantas sean capaces de desarrollar funciones similares. Por medio del análisis de mutantes con niveles disminuidos de la proteína AtMago (en *Arabidopsis*), se pudo observar una orientación defectuosa del tubo polínico, poniendo en evidencia la importancia de esta proteína en los procesos de desarrollo de la planta (Johnson y col., 2004). Años más tarde Park y colaboradores realizaron un meticuloso estudio de la función de la proteína AtMago empleando técnicas de ARN de interferencia. De esta manera, encontraron que las plantas transgénicas presentaban un retardo en el desarrollo en su conjunto, produciendo un mayor número de hojas pero más pequeñas, y tallos más cortos. Los meristemas del tallo carecían de una organización celular, pero poseían una mayor vacuolización y grandes espacios intercelulares. Además, las raíces laterales eran más cortas, careciendo de un perfil celular normal y con una diferenciación de los pelos radiculares prematura. La producción de polen y su tasa de germinación era notoriamente menor a la observada en las plantas de tipo salvaje. Todas estas evidencias pondrían de manifiesto una función esencial de AtMago en la mayoría o quizás en todos los tipos celulares de la planta. Un análisis similar se intentó realizar con la proteína AtY14. Sin embargo, los autores no lograron obtener plantas con menores niveles de esta proteína, sugiriendo

que la planta sería más sensible a una disminución en las cantidades de la misma (Park y col., 2009).

Por otra parte, las versiones de *Arabidopsis* de las proteínas Mago, Y14 y Pym (designadas en general como AtMago, AtY14 y AtPym, respectivamente) muestran ciertas particularidades que las distinguen de sus pares de mamíferos y *Drosophila*. En primer lugar, una mutación específica en un residuo conservado de leucina en AtY14 en la posición 140, descrita previamente en *Drosophila* (Fribourg y col., 2003), no anuló la interacción *in vitro* entre AtMago y AtY14. En segundo lugar, AtPym es capaz de unir AtMago y AtY14 en forma individual, como así también cuando forman un heterodímero entre ambas, empleando para tal fin distintas regiones del polipéptido (Park y Muench, 2007). Esto contrastaría con los resultados obtenidos en células humanas y descritos previamente (Bono y col., 2004). En este sentido, AtPym compromete su región central y una porción del extremo C terminal en su interacción con AtMago monomérica, mientras que sólo emplea su región N terminal en la unión al heterodímero AtMago-AtY14 o a AtY14 monomérica. Sin embargo, también existirían contribuciones del extremo C terminal de AtPym en su interacción con el heterodímero (Park y Muench, 2007).

Por medio de técnicas de inmunoprecipitación con extractos de proteínas, se pudo observar una débil interacción entre AtPym y el heterodímero AtMago-AtY14 (Park y Muench, 2007). Sin embargo, ensayos similares realizados en células de *Drosophila* mostraron una interacción muy estable entre ellas (Forler y col., 2003).

Del análisis estructural del complejo Mago-Y14-Pym en *Drosophila*, se desprende que once aminoácidos están involucrados en la interacción directa entre ellas (Bono y col., 2004). A pesar de que la mayoría de estos residuos están conservados en las proteínas de *Arabidopsis*, existen dos que están implicados en la interacción entre Pym e Y14 (Pym-K30 e Y14-F112) que no están conservados en las proteínas de la planta. Estas sustituciones aminoacídicas (AtPym-K30R y AtY14-F112Y) podrían potencialmente reforzar la unión entre AtPym y AtY14 por medio de la adición de un puente hidrógeno putativo e interacciones hidrofílicas que se establecerían como

consecuencia de estas sustituciones. Este potencial incremento en la “fuerza de unión” podría ser responsable de una interacción entre la región N terminal de AtPym y AtY14 observada *in vitro* (Park y Muench, 2007).

En cuanto a la localización de las tres proteínas, por medio de microscopía de fluorescencia se pudo determinar que AtMago y AtY14 están ubicadas principalmente en el núcleo, mientras que AtPym posee una localización predominantemente citoplasmática (Park y Muench, 2007). Resultados similares fueron obtenidos a partir del estudio de las proteínas TcMago y TcY14 de *Taiwania cryptomerioides*. Además, mediante ensayos de hibridización *in situ* e inmunolocalización se observó expresión en los pelos de la raíz tanto a nivel de ARNm como de proteína. Más aún, la sobre-expresión de TcMago en plantas de tabaco condujo a un fenotipo caracterizado por raíces más largas y un sistema radicular más complejo, sugiriendo un posible rol de la proteína en el desarrollo de este órgano de la planta (Chen y col., 2007).

En nuestro laboratorio se han estudiado los mecanismos de expresión de genes de las subunidades del complejo citocromo c oxidasa de plantas. Resultados previos indicaron que existiría una coordinación en la expresión de genes de las subunidades AtCox6a y AtCox6b de *Arabidopsis thaliana* ante algunos estímulos metabólicos o ambientales. Por este motivo, durante el desarrollo de esta Tesis se estudiaron en detalle las regiones promotoras de los genes respectivos. Asimismo, a partir de los resultados obtenidos del estudio de la expresión de genes *AtCOX5c* y del efecto que presenta en su regulación el intrón ubicado en su región 5' UTR, nos interesó analizar algunas de las proteínas involucradas en el mecanismo de inducción de la expresión mediada por intrones y que forman parte del EJC, cuyo conocimiento en plantas es muy escaso.

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS

El objetivo general del presente trabajo de Tesis es determinar la estructura y los mecanismos de expresión de genes involucrados en la biogénesis de la citocromo c oxidasa de plantas, en particular de aquellos que codifican las subunidades AtCox6. Por otra parte, nos proponemos dilucidar el mecanismo mediante el cual se produce el aumento de la expresión génica mediada por intrones, analizando algunas de las proteínas que componen el complejo de la unión entre exones (EJC) en *Arabidopsis thaliana*.

Los objetivos específicos del plan de trabajo son:

1. Aislar las regiones promotoras de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3* y estudiar su funcionalidad mediante experimentos de transformación de plantas con construcciones adecuadas.
2. Analizar los patrones de expresión conferidos por los promotores de los distintos genes nombrados anteriormente, y determinar si existen mecanismos o factores comunes involucrados.
3. Estudiar la respuesta de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3* frente a distintos factores físicos y químicos.
4. Realizar un estudio funcional de las regiones promotoras de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM*, involucrados en la formación del complejo de la unión entre exones (EJC) de *Arabidopsis thaliana*, y dilucidar si existen elementos *cis* comunes entre ellas.
5. Analizar el efecto de la sobreexpresión de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM* y las derivaciones a nivel funcional de las modificaciones post-traduccionales de las proteínas codificadas por los mismos.

6. Evaluar el rol de las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym en la expresión génica mediada por intrones en *Arabidopsis thaliana*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material utilizado

2.1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo de las plantas de *Arabidopsis thaliana*

Los ensayos llevados a cabo durante la etapa experimental de este trabajo se realizaron utilizando la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* Heyhn. ecotipo Columbia (Col-0) fueron provistas por Lehle Seeds (Tucson, AZ, USA).

2.1.1.1. Condiciones generales de crecimiento en cámara de cultivo

Las plantas fueron crecidas en una cámara de cultivo bajo condiciones de temperatura, humedad e iluminación controladas. Las mismas simulaban un fotoperíodo denominado de “día largo”, el cual consiste en 16 horas de luz a una temperatura comprendida entre 23°C y 26°C y 8 horas de oscuridad. La humedad se mantuvo en un rango variable entre 40-70%. Las condiciones de iluminación fueron logradas con una combinación de lámparas fluorescentes blancas frías (luz día) y de tipo GroLux (Silvania, Vinhedo, SP, Brasil), con una densidad de flujo de fotones fotosintética de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.1.1.2. Plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas para la infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de plantas de *Arabidopsis* se realizó mediante el método de inmersión floral (“floral dip”) utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998). Para tal fin, se sembraron semillas en macetas con tierra (aproximadamente 10 semillas por maceta). Las macetas fueron sub-irrigadas durante todo el período de crecimiento de las plantas. Estas plantas se dejaron crecer hasta el momento de la floración (aproximadamente cuatro semanas para las condiciones de cultivo empleadas), momento en el que se empezaron a cortar las inflorescencias de manera de aumentar el número de flores por planta.

2.1.1.3. Plantas transformantes de *Arabidopsis*

Para la realización de ensayos de medida de la actividad GUS por fluorometría o histoquímica (ver apartado 2.2.9.4), las plantas transformadas con distintas construcciones de las regiones promotoras en estudio fusionadas al gen reportero *gus* fueron sembradas en placas de Petri con medio MS 0,5X suplementado con vitaminas de Gamborg 1X, 0,8% agar y el antibiótico kanamicina en una concentración de 50 µg/ml, respectivamente. Para el análisis de la expresión del gen reportero a través de histoquímica las placas fueron incubadas a 4°C durante 3 días y luego transferidas a la cámara de cultivo, realizando un seguimiento de la expresión del gen reportero en las primeras etapas del desarrollo. Luego de 15 días, las plantas fueron transplantadas a macetas con tierra y se continuó el análisis de los diferentes órganos. Para los ensayos

de actividad específica las plantas fueron cosechadas durante su seguimiento, ya sea en placas de Petri o en tierra, con la finalidad de realizar un análisis simultáneo al correspondiente análisis histoquímico.

2.1.2. Cepas utilizadas

Cepas de *Escherichia coli* utilizadas

DH5 α (supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 (NaI^r) thi-1 relA1) (Hanahan, 1983)

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

BL21: *hsdS gal (λ cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)* (Studier y col., 1986)

Cepas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas

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

LB4404 presenta resistencia cromosómica al antibiótico rifampicina (100 mg/l). Esta cepa utiliza el sistema binario de transformación de *Agrobacterium* y posee el plásmido pTi/pRi desarmado pAL4404 (cuyo agente selectivo es la estreptomicina (300 mg/l)) en

la cepa Ach5. Esta cepa además posee el plásmido pTi/pRi pTiAch5 (Ooms y col., 1982).

2.1.3. Vectores utilizados

2.1.3.1. Vectores para el clonado de fragmentos de ADN

- **pCR 2.1-TOPO**: Amp^R, Kan^R, P_{lac}, *lacZα*, P_{T7}, fl(-) y pMB1 ori (Invitrogen).
- **pBI 101.3**: derivado del vector binario pBIN19, contiene el gen que codifica la enzima β-glucuronidasa de *E. coli* (*gus*) con la señal de poliadenilación de la nopalina sintetasa (*nos*) clonados tras una secuencia múltiple de clonado idéntica a la del vector pUC119. Dentro de la región de movilización del ADN, necesaria para la transformación de plantas, se encuentra el gen *nptII* (confiere resistencia al antibiótico kanamicina). Incluye además el gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano RK2 (Jefferson y col., 1987). Este vector se empleó para la transformación de células competentes de *A. tumefaciens* (punto 2.2.5.2), las que posteriormente se utilizaron para transformar plantas de *A. thaliana* (ver 2.2.9.1).
- **pBI 121**: derivado del vector pBI101.3, contiene un fragmento de 800 pb del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) frente al gen *gus* (Jefferson y col., 1987). Este vector permitió la sobreexpresión de proteínas de interés en *A. thaliana*.

2.1.3.2. Vectores para la expresión de proteínas recombinantes en bacterias

- **pGEX-4T-3:** P_{tac}, *gst*, lacI^q, pBR322 ori, Amp^R (Amersham Pharmacia Biotech). Este vector se empleó para la expresión de proteínas recombinantes como proteínas de fusión a la glutatión *S*-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*.
- **pMALc-2:** pBR322 ori, P_{tac}, *malE*, T_{rimB}, Amp^R (New England Biolabs). Se empleó para la expresión de proteínas recombinantes como proteínas de fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP).

2.2 Metodología empleada

2.2.1. Métodos de clonado

2.2.1.1. Aislamiento y clonado de las regiones promotoras de interés de *Arabidopsis thaliana*

Las regiones promotoras de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b*, *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM* fueron obtenidas por PCR utilizando como molde ADN genómico de *Arabidopsis thaliana*, purificado como se describe en el punto 2.2.6.2. y oligonucleótidos específicos.

2.2.1.1.1 Clonado de la región promotora del gen *AtCOX6a* (At4g37830)

En el caso del gen *AtCOX6a*, se amplificó inicialmente por PCR (punto 2.2.2) un fragmento de 1000 pb ubicado corriente arriba desde el sitio de inicio de la traducción utilizando los oligonucleótidos específicos COX6aF y COX6aR, que introducen los sitios *Sal*I y *Bam*HI, respectivamente, lo que permitió su clonado en el vector pBI101.3 (ver anexo I). Asimismo, se realizaron acortamientos sucesivos de dicha región promotora a partir del extremo distal, con el objetivo de determinar qué motivos son

relevantes para la expresión del mencionado gen y su posible respuesta ante diferentes factores. De esta manera, empleando los oligonucleótidos COXaACORT1F, COXaACORT2F, COXaACORT3F, COXaACORT4F y COX6a.1F se obtuvieron fragmentos de 742 pb, 636 pb, 508pb, 357 pb y 162 pb, respectivamente, de dicha región promotora.

Una vez acotada la zona responsable de la expresión del gen, se realizaron mutaciones puntuales de las 4 copias del elemento conocido como *site II*, siguiendo la técnica descrita por Silver y colaboradores (1995). Para lograrlo, se realizaron dos amplificaciones por PCR utilizando oligonucleótidos que hibridaban a ambos lados de la región a mutar. Los mismos se nombraron 6aMUTIIR y 6aMUTIIF (véase Anexo I) y fueron usados en reacciones de PCR con los oligonucleótidos COX6aF y COX6aR, respectivamente. Los productos fueron purificados y mezclados en un tubo de reacción que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 10 mM MgSO₄, y 0,1 mM DTT. Esta mezcla de reacción se incubó a 95°C durante 5 min y luego se hizo descender lentamente la temperatura hasta los 25°C aproximadamente de manera tal de favorecer la hibridación entre las regiones complementarias de los dos productos de PCR generados en el paso anterior. Seguidamente, se adicionó al tubo de reacción 0,5 mM de cada dNTP y 5 unidades de la enzima Klenow ADN polimerasa I (Promega), y se realizó una incubación durante 1 h a 37°C para extender los fragmentos hibridados. Una alícuota de esta reacción fue utilizada directamente para amplificar el fragmento quimérico empleando los oligonucleótidos COX6aF y COX6aR.

Las secuencias de los distintos oligonucleótidos utilizados y los sitios de restricción que permiten los clonados se describen en el anexo I y las diferentes construcciones se detallan en Resultados y Discusión.

2.2.1.1.2 Clonado de la región promotora del gen *AtCOX6b-1* (At1g22450)

En este caso, se realizó la amplificación de un fragmento de 1262 pb ubicado corriente arriba del sitio de inicio ATG. Para lograrlo se emplearon los oligonucleótidos COX6b-1F y COX6b-1R (ver anexo I), que adicionaban los sitios de restricción *SalI* y *BamHI*, respectivamente. Además, se realizaron acortamientos sucesivos a partir del extremo distal de dicha región promotora empleando los oligonucleótidos COX6b-1ACORT1F, COX6b-1ACORT2F y COX6b-1.1 que permitieron amplificar fragmentos de 689 pb, 458 pb y 238 pb, respectivamente. Luego, se realizaron tres deleciones sucesivas, de 60 pb cada una, de la secuencia de 180 pb comprendida entre el último elemento *site II* (el más cercano al sitio de inicio de la traducción) y el codón ATG, empleando los oligonucleótidos COX6b1/1F, COX6b1/1R, COX6b1/3F, COX6b1/3R y COX6b1/2 detallados en el anexo I.

Por otra parte, se realizó la mutación sitio dirigida de las dos copias del elemento *site II* que dicha región promotora posee, empleando los oligonucleótidos 6B-1MUTIIF y 6B-1MUTIIR y procediendo en forma análoga a la descrita anteriormente para el caso de la región promotora del gen *AtCOX6a*.

Asimismo, se realizó la mutagénesis del elemento de respuesta a sacarosa (SURE) que esta secuencia promotora posee, utilizando los oligonucleótidos 6b1MUTSACF y 6b1MUTSACR y siguiendo una estrategia similar a la empleada en la mutación de los elementos *site II*.

2.2.1.1.3 Clonado de la región promotora del gen *AtCOX6b-2* (At5g57815)

La región promotora putativa del gen *AtCOX6b-2* fue obtenida empleando los oligonucleótidos COX6b2F y COX6b2R, amplificándose un fragmento de 1155 pb ubicado corriente arriba del codón ATG. Asimismo, se obtuvo un promotor mínimo (196 pb) que contiene los elementos *site II* (cuatro copias) en su secuencia. Finalmente, siguiendo una estrategia similar a la mencionada anteriormente, se procedió a mutar los elementos mencionados empleando los oligonucleótidos 6B-2MUTIIF y 6B-2MUTIIR. Para realizar la mutación de los 2 elementos SURE que esta región promotora contiene,

se emplearon los oligonucleótidos 6b2MUTSAC1F y 6b2MUTSAC1R; 6b2MUTSAC2F y 6b2MUTSAC2F.

2.2.1.1.4 Clonado de la región promotora del gen *AtCOX6b-3* (At4g28060)

Empleando los oligonucleótidos COX6b3F y COX6b3R, se amplificó la región promotora putativa del gen *AtCOX6b-3* (1162 pb corriente arriba del codón ATG). De igual manera, se realizaron 3 acortamientos sucesivos desde el extremo distal utilizando los oligonucleótidos COX6b-3ACORT1F, COX6b-3ACORT2F y COX6b-3.1F, que permitieron obtener fragmentos de ADN de 867 pb, 499 pb y 199 pb, respectivamente. La mutagénesis sitio dirigida de los elementos *site II* (dos copias) se realizó empleando los oligonucleótidos 6B-3MUTIIF y 6B-3MUTIIR, mientras que la mutación del elemento de respuesta a sacarosa (SURE) se consiguió utilizando los oligonucleótidos 6b3MUTSACF y 6b3MUTSACR.

2.2.1.1.5 Clonado de la región promotora del gen *AtMAGO* (At1g02140)

La región promotora putativa del gen *AtMAGO* se obtuvo empleando los oligonucleótidos PromotorMagoF y PromotorMagoR (que adicionan los sitios de restricción *SalI* y *BamHI*, respectivamente), amplificándose un fragmento de 2135 pb, que incluía la región 5' no codificante completa del mencionado gen. Asimismo, se amplificó una versión acortada de dicha región promotora utilizando los oligonucleótidos PromotorMago.1F y PromotorMagoR, obteniéndose un fragmento de 521 pb, que también incluía la región 5' no codificante mencionada. Con el fin de mutagenizar los elementos *site II* (tres copias) presentes en la secuencia promotora analizada, se emplearon los oligonucleótidos Magomut1F, Magomut1R, Magomut2F y Magomut2R, siguiendo una estrategia similar a la descrita inicialmente.

2.2.1.1.6 Clonado de la región promotora del gen *AtY14* (At1g51510)

Empleando los oligonucleótidos específicos PromotorY14F y PromotorY14R (que adicionan los sitios de restricción *SaII* y *XbaI*, respectivamente) se amplificó un fragmento de ADN de 2177 pb, incluyendo la región 5' no codificante del gen. Luego, se obtuvo una versión acortada del mismo de 473 pb que también incluía la región 5' no codificante mencionada, empleando para tal fin los oligonucleótidos PromotorY14.1F y PromotorY14R. La secuencia promotora analizada posee 4 copias del elemento *site II*. La mutagénesis de las mismas se consiguió utilizando los oligonucleótidos Y14mut1F, Y14mut1R, Y14mut2F y Y14mut2R.

2.2.1.1.7 Clonado de la región promotora del gen *AtPYM* (*At1g11400*)

La región promotora putativa del gen *AtPYM* se obtuvo empleando los oligonucleótidos pPymF y pPymR (que adicionan los sitios de restricción *XhoI* y *XbaI*, respectivamente). De esta manera, se amplificó un fragmento de 2253 pb que incluía la región 5' no codificante del gen. Esta región contiene un intrón de 727 pb. Por tal motivo, se realizó la delección completa del mismo empleando los oligonucleótidos pPymDelIF y pPymDelIR. Por otra parte, se realizó la delección del primer exón de dicho gen, dejando únicamente los nucleótidos necesarios para la realización del proceso de “splicing” del intrón correspondiente. Para lograrlo se emplearon los oligonucleótidos PpymDelE1AF y PpymDelE1AR.

La región promotora analizada contiene, además, dos copias del elemento *site II* en su secuencia. Para poder llevar a cabo su mutagénesis, se emplearon los oligonucleótidos Pymmut1F, Pymmut1R, Pymmut2F y Pymmut2R.

2.2.1.2. Sobreexpresión de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM* en *Arabidopsis thaliana*

Para la sobreexpresión de los genes de interés se realizó el clonado de los mismos en el vector binario pBI121, que permite expresarlos bajo el control del

promotor 35SCaMV. Este promotor confiere una fuerte expresión constitutiva de los genes que antecede. Para lograr el clonado, se obtuvieron en primer lugar los ADNc completos de los tres genes analizados. Estos se amplificaron por PCR utilizando como molde el producto de una reacción de transcripción reversa (ver punto 2.2.7.6) de un extracto total de ARN de plántulas, de 15 días de desarrollo, de *Arabidopsis thaliana* (ver punto 2.2.6.3), empleando los oligonucleótidos cDNAMagoF y cDNAMagoR; cDNAY14F y cDNAY14R o cDNAPymF y cDNAPymR.

2.2.2. Amplificación por PCR de fragmentos de ADN (reacción en cadena de la polimerasa)

En las reacciones de amplificación por PCR se usaron en todos los casos volúmenes de reacción de 50 µl, empleándose 1,5 U de la enzima *Taq* ADN polimerasa (Promega) por reacción. Se utilizó la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, a la cual se agregó: MgCl₂ 2 mM; dNTP 0,2 mM c/u y 500 ng de cada oligonucleótido específico. A esta mezcla de reacción se le incorporaron el ADN molde y la enzima. Finalmente, se añadió una gota de aceite mineral (Promega) y se procedió a la reacción de amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador PT-100™ (MJ Research, Inc.) utilizando los programas apropiados para cada caso y la temperatura de hibridización se estableció de acuerdo a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados [$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$]. Los productos de las reacciones de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa según el punto 2.2.7.3.

2.2.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

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

2.2.4. Ligación de moléculas de ADN

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega) en un volumen de reacción de 10 μl y empleando la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector tales que la relación molar entre ambos fuera de 5 a 1, respectivamente. La incubación se realizó durante toda la noche a 4°C o 16°C.

2.2.5. Transformación de bacterias

2.2.5.1. Transformación de *Escherichia coli* con ADN plasmídico por electroporación

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (*Gene*

Pulser™, Bio-Rad Laboratories Inc., USA). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,1 cm de separación entre los electrodos (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB (ver anexo II) a la suspensión de células y se las incubó durante 1 hora a 37°C. Después de centrifugar a 4000 x g durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 100 µl de medio LB y se sembró en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado. Luego de crecidas las colonias, se realizó minipreparación de plásmidos como se detalla en el punto 2.2.6.1 y los plásmidos obtenidos se analizaron por digestión con enzimas de restricción y/o PCR. Los clones positivos se guardaron en medio líquido con el agregado de los antibióticos correspondientes a -80°C en glicerol 50%.

2.2.5.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con ADN plasmídico

2.2.5.2.1. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* a través de choque térmico

Para la preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* y su posterior transformación, se utilizó el método descrito por Höfgen y Willmitzer (1988). Las células bacterianas se cultivaron 12 horas en medio LB en presencia de rifampicina 50 mg/l a 28°C con agitación. Con este cultivo saturado se inocularon 200 ml de medio LB fresco suplementado con antibiótico y se dejó crecer durante 4-5 horas. Se cosecharon las células por centrifugación a 3000 x g durante 20 min a 4°C y el sedimento se lavó con TE (ver anexo II). El sedimento final fue resuspendido en 20 ml de medio LB con rifampicina 50 µg/ml y se fraccionaron alícuotas de 500 µl. Las

células competentes, luego del agregado de 0,5-1 μg de ADN plasmídico, se mantuvieron en hielo 5 min y se sometieron sucesivamente a tratamientos de 5 min en N_2 líquido y 5 min a 37°C . Luego de agregar 1 ml de medio LB líquido, las células se incubaron durante 2 horas a 28°C con agitación. Luego de la incubación, se centrifugaron los tubos a $5000 \times g$ durante 5 min y se sembraron alícuotas de 200 μl en placas con LB en 1,5% agar suplementado con los antibióticos kanamicina y rifampicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada uno. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas. Las colonias se cultivaron en LB líquido en presencia de los antibióticos, se realizó minipreparación de plásmidos como se detalla en el punto 2.2.6.1 y los plásmidos obtenidos se analizaron por PCR. Los clones positivos se guardaron en medio líquido con el agregado de antibióticos a -80°C en glicerol 50%.

2.2.5.2.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* a través de electroporación

La preparación de las células competentes y las condiciones de electroporación empleadas fueron las recomendadas en el manual del fabricante del equipo (*Gene PulserTM*, Bio-Rad). El choque eléctrico se realizó en cubetas de 0,25 cm (Bio-Rad). Inmediatamente después del disparo se adicionó 1 ml de medio LB a la suspensión de células y la mezcla se incubó durante 2 horas a 28°C . Después de centrifugar a $4000 \times g$ durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 100 μl de medio LB y se sembró en placas de Petri que contenían medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Las placas fueron incubadas a 28°C hasta la aparición de colonias (aproximadamente 48 horas). Luego, se realizó minipreparación de plásmidos como se detalla en el punto 2.2.6.1 y los plásmidos obtenidos se analizaron por PCR. Los clones

positivos se guardaron en medio líquido con el agregado de antibióticos a -80°C en glicerol 50%.

2.2.6. Preparación de ácidos nucleicos

2.2.6.1. Minipreparación de ADN plasmídico

Las preparaciones de plásmidos a partir de células de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* transformadas se realizaron según el protocolo de Birnboim y Dolly (1979). Se centrifugaron 1,5 ml de un cultivo saturado de células cultivadas en medio LB con el antibiótico adecuado, a $5000 \times g$ durante 5 min. El sedimento celular fue resuspendido en 100 μl de solución de miniprep I (ver anexo II). Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se agregaron 200 μl de solución de miniprep II (ver anexo II). Se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Se agregaron 150 μl de acetato de potasio 5 M (pH 5,2) y se incubó nuevamente en hielo durante 15 min. Se centrifugó a $12000 \times g$ durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se trató con 400 μl de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó durante 5 min a $8000 \times g$ a temperatura ambiente y el ADN de la fase acuosa se precipitó durante 2 horas a -20°C con 2 vol de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2). El ADN plasmídico se recuperó por centrifugación a $12000 \times g$ durante 10 min a 4°C y se lavó con etanol 70% (v/v) para eliminar sales. Se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 20 μl de agua destilada estéril.

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

2.2.6.2. Minipreparación de ADN de *Arabidopsis thaliana*

El ADN de hojas de *Arabidopsis* se preparó siguiendo la técnica de Li y Chory (1998). Una ó 2 hojas de la planta se disgregaron con un pilón plástico en tubo Eppendorf a temperatura ambiente durante 15 seg. Se agregaron 700 µl de solución amortiguadora de extracción (ver anexo II) y se mezcló en vórtex durante 5 segundos. Se centrifugó durante 10 min a 15000 x g y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 600 µl de isopropanol frío, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 15000 x g durante 10 min. El precipitado de ADN se lavó con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

2.2.6.3. Extracción y purificación de ARN de *Arabidopsis thaliana*

2.2.6.3.1. Metodología empleando LiCl

El ARN se preparó según la técnica de Carpenter y Simon (1998). Se procesaron 2 g de plantas enteras en mortero con N₂ líquido hasta polvo fino, el que se transfirió a un tubo de 30 ml. Se agregaron 10 ml de solución amortiguadora de extracción (ver anexo II) y se mezcló vigorosamente. Se agregaron 10 ml de fenol saturado en agua y se centrifugó durante 5 min a 5000 x g a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa

y se repitió el paso anterior con 10 ml de fenol y posteriormente con 10 ml de cloroformo. A la fase acuosa final se le agregaron 2 vol de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M (pH 5,3) y se incubó durante 30 min a -70°C . Se recuperó el ARN por centrifugación a $12000 \times g$ durante 10 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en LiCl 2 M. Luego de incubar en hielo toda la noche, se centrifugó en iguales condiciones a las utilizadas en el paso anterior y el precipitado se disolvió en 400 μl de agua destilada estéril. Se agregaron 2 vol de etanol absoluto frío en medio acetato de sodio 0,3 M (pH 5,3). Luego de incubar 5 min a -70°C , se recuperó el ARN por centrifugación a $12000 \times g$ durante 5 min, se lavó el precipitado con etanol 70% (v/v), se secó y se resuspendió en 100 μl de agua destilada estéril.

2.2.6.3.2. Metodología empleando el reactivo Trizol

Cuando el ARN se preparó utilizando el reactivo Trizol [fenol ácido 38% (p/v); tiocianato de guanidina 0,8 M; tiocianato de amonio 0,4 M; acetato de sodio 0,1 M pH 5,0; glicerol 5% (v/v)], se procesaron 100 mg de muestra en mortero con N_2 líquido hasta polvo fino, el cual se transfirió a un tubo Eppendorf. Se agregó 1 ml de reactivo Trizol, se mezcló vigorosamente y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Luego de transcurrido este tiempo, las muestras se colocaron en hielo. Se agregaron 0,2 ml de cloroformo (1/5 vol respecto del de reactivo Trizol), se mezcló vigorosamente en forma manual durante 15 seg y se centrifugó a $12000 \times g$ durante 15 min a 4°C . Se recuperó la fase acuosa (aproximadamente 0,75 ml) y se repitió el paso anterior con 0,75 ml de mezcla fenol/cloroformo [1:1 (v/v)]. A la fase acuosa final se le agregaron

dos volúmenes de etanol absoluto (o un volumen de isopropanol) frío y se incubó durante 30 min a -80°C . Se recuperó el ARN por centrifugación a $12000 \times g$ durante 15 min a 4°C , se lavó el precipitado con etanol 70% (v/v), se secó y se resuspendió en 100 μl de agua destilada estéril.

2.2.7. Análisis de ácidos nucleicos

2.2.7.1. Cuantificación de ácidos nucleicos

La calidad y cantidad del ADN purificado se analizó por lectura espectrofotométrica a 260/280 nm, considerando que $\text{DO}_{260} = 1$ equivale a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN, y por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% en presencia de bromuro de etidio 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La concentración de ARN en solución se estimó a partir de la absorbancia a 260 nm, considerando que $\text{DO}_{260} = 1$ corresponde a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ARN y se evaluó su calidad por corrida en geles de agarosa 1,5% en condiciones desnaturalizantes y tinción con bromuro de etidio 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de muestra sembrada.

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

El equipo comercial *T7 Sequencing Kit* (USB Corporation) se empleó para determinar la secuencia de los fragmentos de ADN clonados. Este kit se basa en el método desarrollado por Sanger y col. (1977) que combina una primera etapa de marcación seguida de una etapa de extensión/terminación por incorporación de didesoxinucleótidos a las cadenas crecientes de ADN. Las reacciones se realizaron

sobre ambas hebras del ADN utilizado como molde, respetando las condiciones sugeridas por los proveedores del equipo. Según el caso, se utilizaron cebadores universales específicos para los plásmidos utilizados o cebadores que reconocían el inserto.

Las reacciones fueron analizadas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en solución amortiguadora TBE (Tris-HCl 89 mM pH 8,0; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM pH 8,0) siguiendo los protocolos descritos por Ausubel y col. (1987). Una vez finalizada la corrida, los geles se colocaron sobre papel Whatman 3MM (Sigma Chemical Company) y se secaron al vacío durante 30 min a 80°C. Luego se expusieron a una placa autorradiográfica con pantalla intensificadora a -80°C durante el tiempo requerido según la marca radioactiva del gel.

Asimismo, se utilizó el servicio de secuenciación provisto por la compañía MacroGen (<http://dna.macrogen.com>), empleándose en este caso oligonucleótidos universales específicos (provistos por la empresa) o cebadores que hibridaban con el inserto.

2.2.7.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa de tipo submarino de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. (1989). La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 y 2% (p/v) de acuerdo con el tamaño de los fragmentos analizados. Los geles fueron preparados en solución TAE 1X (ver anexo II). El ADN se sembró con 1/10 vol de solución de siembra (ver anexo II) y fue visualizado por tinción

con bromuro de etidio 0,3 µg/ml. Las corridas electroforéticas se realizaron en solución TAE 1X a una intensidad de corriente constante de 70 mA y se utilizaron como marcadores de tamaño los fragmentos generados al digerir ADN del bacteriófago λ (Promega) con la enzima de restricción *Hind*III (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb). Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador de luz UV ($\lambda=310$ nm).

2.2.7.4. Electroforesis de ARN en geles de agarosa desnaturalizantes

Para realizar la corrida electroforética de ARN en condiciones desnaturalizantes se sembraron 20 µg de ARN por calle (cuantificado por lectura de la absorbancia a 260 nm). Antes de sembrar, las muestras fueron desnaturalizadas mezclando 1 vol. de ARN en solución acuosa y 3 vol. de solución de desnaturalización (formamida 66% (v/v); HEPES 1,3X y formaldehído 8% (p/v)) e incubando esta mezcla a 65°C durante 5 min.

Los geles en condiciones desnaturalizantes se prepararon con agarosa 1,5% (p/v) en solución amortiguadora HEPES 1X (pH 7,8) y formaldehído 6% (p/v) según Ausubel y col. (1987). A cada muestra a sembrar se le agregaron 1/10 vol. de solución de siembra (ver anexo II) y 2,5 a 5 µg de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó en solución de HEPES 1X en forma submarina y a intensidad de corriente constante de 40 mA. Para la visualización de los geles se utilizó un transiluminador de luz UV ($\lambda=310$ nm).

2.2.7.5. Técnica de northern blot

Los geles de separación de ARN por electroforesis descritos en el punto **2.2.7.4** se transfirieron por capilaridad en medio SSC 6X (ver anexo II) a membranas de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences). Las membranas fueron secadas y fijadas por exposición a radiación ultravioleta ($\lambda=310$ nm) durante 3-5 min. Luego fueron hibridizadas con las sondas apropiadas, lavadas y expuestas a películas Kodak X-AR o Kodak Biomax MS como se describe en el punto 2.2.7.7. Para analizar los niveles de ARN transferido, los filtros fueron hibridizados con una sonda de ARNr 25S de *Vicia faba* en condiciones similares a las descritas en el punto 2.2.7.7, pero a 68°C.

2.2.7.6. Transcripción reversa

Para esta reacción se utilizó como molde ARN total de *Arabidopsis thaliana*. En un primer paso se agregó 0,1 μ M del oligonucleótido dT_v (ver anexo I) junto con 1 μ g de ARN total, y se incubó a 65°C durante 5 min a fin de desarmar las estructuras secundarias del ARN. Inmediatamente después de pasados los 5 min, la mezcla fue colocada en hielo. A continuación se agregaron dNTPs (5 mM de c/u), la solución amortiguadora de la enzima y 200 U de Transcriptasa Reversa M-MLV (Promega), hasta un volumen final de 30 μ l. La reacción se dejó transcurrir durante 1,5 horas a 42°C y luego se inactivó la enzima durante 5 min a 80°C más 30 seg a 94°C. Una alícuota del ADNc obtenido fue utilizada como molde para una reacción de PCR (según se describe en el punto 2.2.2) con oligonucleótidos específicos de acuerdo al ADNc que se deseó amplificar. Con el propósito de comparar los niveles de ARN total utilizados en cada

muestra, se realizó en paralelo una amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de genes de actinas (ACTINA2 y ACTINA8; Charrier y col., 2002), denominados Actin-F y Actin-R (ver anexo I).

2.2.7.7. Hibridización de membranas de nylon

Las membranas de nylon a las cuales se fijaron los ARN fueron prehibridizadas a 65°C en horno de hibridización durante por lo menos 2 horas en solución SSC 5X, Denhardt's 5X (ver anexo II) y SDS 0,2% (p/v). La hibridización se realizó en las mismas condiciones pero con el agregado de la sonda marcada correspondiente y durante toda la noche. Luego de la hibridización, los filtros a los que se habían transferido los ARN se lavaron 3 veces a 65°C durante 15 min con SSC 2X. Luego de los lavados se secaron y expusieron a películas Kodak X-AR o Kodak Biomax MS según cada caso.

2.2.7.8. Marcación de sondas de ADN

2.2.7.8.1. Purificación de fragmentos de ADN

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

2.2.7.8.2. Marcado radioactivo de los fragmentos de ADN

La marcación de ADN doble hebra se realizó utilizando el método de cebado al azar (Feinberg y Vogelstein, 1983). Para la desnaturalización del ADN doble hebra, se incubaron aproximadamente 100 ng en un volumen de 35 μ l de agua a 100°C durante 3-5 min. Luego de transferir la mezcla inmediatamente a hielo, se agregaron 10 μ l de solución OLB (ver anexo II), 2 μ l de ASB 10 mg/ml, 2 μ l de [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l, NEN) y 2-3 U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (5 U/ μ l, Promega, Madison, WI, USA). La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente entre 3 y 15 h, se diluyó en 200 μ l finales de agua y se filtró a través de una columna de Sephadex G-50 según el método descrito por Ausubel y col. (1987), para eliminar el exceso de [α -³²P]dATP no incorporado. La sonda purificada (actividad específica de aproximadamente 10⁸ cpm/ μ g) fue desnaturalizada a 100°C durante 3 min y diluida en una cantidad adecuada de solución de hibridización como lo indica el punto 2.2.7.7.

2.2.7.9. Marcación radioactiva de fragmentos de ADN para ensayos de retardo en gel

La marcación radioactiva de los fragmentos de ADN empleados en los experimentos de retardo en gel se llevó a cabo utilizando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Los fragmentos de ADN doble hebra se obtuvieron por amplificación por PCR (punto 2.2.2) con los pares de oligonucleótidos adecuados según cada caso. Luego se procedió a una digestión con endonucleasas de restricción (punto 2.2.3) y el/los extremo/s cohesivos fueron rellenados en presencia de 5 μ Ci de [α -³²P]dATP (3000Ci/mmol), dCTP, dGTP y dTTP 0,2 mM cada uno, solución

amortiguadora suministrada por el fabricante de la enzima y 2 U de Klenow durante 60 min a 37° C. El exceso de [α -³²P]dATP no incorporado se eliminó mediante filtración a través de una columna de Sephadex G-50 según el método descrito por Ausubel y col. (1987).

Para purificar los fragmentos marcados, los mismos se sembraron en geles verticales de poliacrilamida [acrilamida 5% (P/V), bis-acrilamida 0,08% (P/V), TBE 0,5 X, glicerol 2,5% (V/V)] usando la solución de siembra para ADN descrita. La corrida se realizó en solución amortiguadora TBE 0,5X a 30 mA durante 1,5 horas. Los geles se desarmaron y se expusieron 5 min a placas radiográficas. Las señales en las placas radiográficas permitieron reconocer en el gel la posición de la banda de interés, la que fue escindida y purificada como se describe a continuación.

2.2.7.10. Elución y purificación de fragmentos de ADN de geles de poliacrilamida

Las bandas recortadas de los geles de poliacrilamida (punto 2.2.7.9) se sumergieron en 1 ml de solución de elución de oligonucleótidos (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; EDTA 20 mM pH 8,0) durante toda la noche a 4°C. Luego, se centrifugó 1 min a 12000 x g, se tomó el sobrenadante y se precipitó agregando un volumen de etanol absoluto frío con 1 μ g de ARNt (Sigma) durante 30 min a -80°C. El ADN purificado se lavó con etanol 70% (v/v), se secó y se resuspendió en agua destilada estéril.

2.2.8. Proteínas

2.2.8.1. Obtención de proteínas

2.2.8.1.1. Extracción de proteínas totales de plántulas de *Arabidopsis thaliana* para ensayos de Western blot

Los extractos proteicos de plántulas de *Arabidopsis* fueron obtenidos de acuerdo al protocolo propuesto por Milosevic y Slusarenko (1996). En primer lugar, se procesaron 0,4 g de tejido vegetal con mortero hasta obtener un polvo fino y se agregó luego 1 ml de solución amortiguadora de extracción (ver anexo II). La mezcla se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 14000 x g durante 20 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se mantuvo en baño de hielo. Luego de determinar su concentración (ver punto 2.2.8.2), se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización.

2.2.8.1.2. Preparación de extractos proteicos nucleares de inflorescencias de coliflor

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

El material se colocó en un mortero previamente enfriado y se agregaron 5 ml de solución de homogenización (ver anexo II) por gramo de tejido procesado. El homogenato se filtró a través de dos mallas de nylon (280 y 80 µm) y se centrifugó a 4225 x g durante 20 min a 4°C. El sedimento enriquecido en núcleos fue lavado cuatro

veces con 20 ml de la misma solución de homogenización sometiendo la suspensión a centrifugaciones sucesivas de 10 min a 1912 x g, 10 min a 1464 x g, 8 min a 1464 x g y 6 min a 1464 x g, todas a 4°C. El sedimento nuclear se resuspendió en 1 ml de solución de almacenamiento (ver anexo II), se congeló en N₂ líquido y se conservó a -80°C. La ruptura de los núcleos se logró agregando 182 µl de solución de lisis [NaCl 2,5 M; Hepes 50 mM pH 7,6; MgCl₂ 5 mM; KCl 10 mM; glicerol 20% (v/v); DTT 1 mM; PMSF 0,2 mM] por cada ml de suspensión y se agitó durante 60 min a 4°C. Luego se centrifugó a 12000 x g durante 20 min a 4°C para separar la cromatina. El sobrenadante fue dializado durante 4 h a 4°C en membranas de diálisis (Sigma) cambiando la solución de diálisis (ver anexo II) al menos 4 veces. La suspensión dializada se centrifugó a 12000 x g durante 5 min a 4°C y la fracción soluble que contenía los extractos proteicos nucleares se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización.

2.2.8.2. Cuantificación de proteínas totales

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método descrito por Sedmak y Grossberg (1977). Como patrón se utilizó una solución de albúmina sérica bovina (ASB) cuya concentración se determinó espectrofotométricamente, considerando 0,667 unidades de $Abs_{(280\text{ nm})} = 1\text{ mg/ml}$ de ASB en solución.

Las determinaciones se realizaron con 3 a 5 µl de extracto proteico en 100 µl de solución de NaCl 0,15 M y 900 µl del reactivo de Azul Brillante de Coomasie (Azul brillante de Coomasie G-250 10 mg%, etanol absoluto 5% (v/v) y ácido fosfórico 10% (v/v)). La absorbancia se determinó en espectrofotómetro a 595 nm.

2.2.8.3. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en presencia de SDS fue llevada a cabo según el método de Laemmli (1970), empleando sistemas de geles verticales. En todos los casos se utilizó una relación de acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (p:p). El gel de separación se preparó en solución Tris-HCl 375 mM (pH 8,9), SDS 0,1% (p/v), con una concentración de acrilamida final de 12-15% (p/v). El gel de concentración se preparó con acrilamida 4,5% (p/v), en solución Tris-HCl 125 mM (pH 6,8), SDS 0,1% (p/v). La separación electroforética fue llevada a cabo en solución LAEMMLI 1X (ver anexo II), aplicando un voltaje constante de 10 V/cm de gel. Las muestras se sembraron previa desnaturalización mediante incubación durante 3 min a 100°C en solución de siembra de proteínas (ver anexo II). Una vez terminada la corrida electroforética los geles fueron sumergidos en solución colorante de proteínas.

En el caso de realizar una electroforesis de proteínas en condiciones nativas, el gel fue preparado de la manera antes descrita pero obviando el agregado de SDS. La separación electroforética fue llevada a cabo en solución amortiguadora Tris-glicina (ver anexo II), aplicando un voltaje constante de 10 V/cm de gel. No se realizó ningún pretratamiento de las muestras antes de sembrarlas en el gel, agregándose sólo solución de siembra (ver anexo II), la cual posee una composición distinta a la empleada en los geles desnaturalizantes. La concentración del gel fue discontinua, es decir, 15% en la región inferior y 10% en la superior.

2.2.8.4. Técnica de Western blot

Luego de la separación de las proteínas en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas o desnaturizantes, tal como se ha descrito anteriormente, éstas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa ECL (Amersham Pharmacia) a través de la generación de un campo eléctrico y en presencia de una solución de transferencia (ver anexo II) durante 1-4 horas a 300 mA y 4°C.

Luego de la transferencia, se bloqueó la membrana durante 1 hora en solución bloqueante (ver anexo II). Transcurrido este tiempo, se retiró la solución bloqueante y se incorporó el primer anticuerpo (antiAtMago, antiAtY14 o antiAtPym) en solución bloqueante fresca, y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se realizaron tres lavados con TBS 1X-Tween 0,1% (p/v) (ver anexo II) y se agregó el anticuerpo secundario (antiIgG de conejo conjugado a peroxidasa) en solución bloqueante. Luego de 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario, se realizaron tres lavados con TBS 1X-Tween 0,1% (p/v) y se reveló con SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE) y posterior exposición a películas CL-X Posure™ Film (PIERCE).

2.2.8.5. Ensayo de fosforilación *in vitro* de proteínas recombinantes

Los ensayos de fosforilación de las proteínas de fusión AtMago-GST, AtY14-GST y AtPym-MBP se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología propuesta por (Gong y col., (2002)). En primer lugar, se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, 3 µg de cada proteína en una solución amortiguadora (ver anexo II) a la cual se agregó ATP (10 µM), 8 µCi de [γ -³²P]ATP y 3 µg de una purificación parcial de proteínas quinasas de trigo, obtenida a partir del protocolo propuesto por Toroser y col., (2000). Luego, la mezcla fue sembrada en un gel de poliacrilamida al 15% en

condiciones desnaturalizantes (ver 2.2.8.3). Una vez finalizada la corrida electroforética, el gel se secó durante 40 min a 80°C y se expuso a una placa radiográfica (Kodak MXG/Plus) con pantalla intensificadora a -80° C durante toda la noche.

2.2.8.6. Ensayo de defosforilación de extractos proteicos de *Arabidopsis thaliana* con fosfatasa alcalina

Los extractos de plántulas de *Arabidopsis* que sobreexpresaban las proteínas AtY14 y AtPym fueron incubados en presencia de la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternero (2U, 4U, 6U y 8U) en una solución amortiguadora (Tris-HCl pH 9,3 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1mM, espermidina 10mM), provista por el fabricante de la enzima (Promega), durante 1 a 2 horas a 37°C.

2.2.8.7. Ensayo *in vitro* de interacción ADN-proteínas

2.2.8.7.1. Ensayos de retardo en gel (Band shift)

Los ensayos de retardo en gel se llevaron a cabo según el protocolo descrito por Sessa y col. (1993) con algunas modificaciones. Las reacciones de unión se realizaron en un volumen final de 18 µl en solución amortiguadora de unión, 10 µg de extracto proteico nuclear (ver punto 2.2.8.1.2) y ADN doble hebra marcado (ver punto 2.2.7.9) correspondiente a 5000 - 10000 cpm.

El tubo con la mezcla de unión se incubó durante 30 min en hielo. Luego se adicionó ficoll 2,5% (p/v) y se sembró en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes

[(acrilamida 5% (p/v), bis-acrilamida 0,08% (p/v), TBE 0,5X y glicerol 2,5% (v/v)] previamente corridos a voltaje constante de 100 V durante 30 min. Una vez sembradas las muestras, la electroforesis se dejó transcurrir durante 2 horas a 4°C o a temperatura ambiente en solución amortiguadora TBE 0,5X [1X: Tris-HCl 89 mM pH 8,0; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0]. Una vez finalizada la corrida, el gel se secó durante 40 min a 80°C y se expuso a una placa radiográfica (Kodak MXG/Plus) con pantalla intensificadora a -80° C durante toda la noche.

2.2.8.8. Ensayo de interacción proteína-proteína *in vitro* (pull-down)

El análisis de la interacción *in vitro* entre las proteínas estudiadas fue llevado a cabo de acuerdo al método descrito por Ausubel y col. (1987), con algunas modificaciones. En primer lugar, se incubaron 3 µg de cada una de las proteínas en una solución amortiguadora (HEPES 20 mM pH 7,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 2 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 1 mM; Triton X-100 0,5% (p/v); glicerol 10% (v/v) y BSA 22 ng/µl), en hielo durante 30 min. Luego, se agregaron 30 µl de una matriz de agarosa unida a amilosa (New England Biolabs). Se incubó durante 3 horas con agitación suave a 4°C. La mezcla se lavó cinco veces con 1 ml de solución amortiguadora de columna de amilosa, centrifugándose a 12000 x g durante 1 min cada vez. En el último lavado se extendió la centrifugación a 5 min y luego se removió cuidadosamente el líquido sobre la resina. A cada muestra a sembrar se le agregaron 1/10 vol de solución de siembra (ver anexo II), se hirvió 5 min y se sembró en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al

15%. Una vez finalizada la corrida, se realizó un ensayo de western blot como se describe en el punto 2.2.8.4.

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

2.2.8.7.1. Proteínas recombinantes fusionadas a glutatión S-transferasa

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

Se empleó una estrategia de PCR con cebadores específicos que incorporaron los sitios de restricción necesarios para lograr la introducción de los insertos en fase en los sitios *Bam*HI y *Eco*RI del vector o pGEX-4T-3. Se llevaron a cabo reacciones de amplificación con la enzima *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) para cada construcción empleando los oligonucleótidos cuyas secuencias se detallan en el anexo I. En todos los casos, la presencia del inserto esperado se comprobó mediante análisis de los productos de digestión con las enzimas indicadas (punto 2.2.3) y, posteriormente, por determinación de la secuencia de ADN (punto 2.2.7.2).

2.2.8.7.2. Proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP)

El plásmido pMal-c2 (New England Biolabs) se utilizó para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* como productos de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli*, lo cual favorece la solubilidad de las proteínas recombinantes y permite purificarlas por cromatografía de afinidad empleando columnas de amilosa-

agarosa. Además, el vector posee el sitio múltiple de clonado entre los genes *malE* y *lacZ α* , por lo que la inserción de la secuencia de interés interrumpe la fusión *malE-lacZ α* y permite seleccionar los plásmidos que han recibido el inserto por pérdida de α -complementación.

El ADNc que codifica la proteína AtPym se obtuvo por PCR empleando los oligonucleótidos Pym-pMALF y Pym-pMALR (que adicionan los sitios de restricción *EcoRI* y *PstI*, respectivamente, necesarios para el clonado en el vector de expresión). Las colonias transformantes de *E. coli* se eligieron por diferenciación entre colonias blancas y azules (α -complementación de la actividad β -galactosidasa de la cepa de origen). La presencia del inserto se comprobó mediante análisis de los productos de digestión con enzimas de restricción y posterior determinación de la secuencia del ADN clonado (punto 2.2.7.2).

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

2.2.8.7.3.1. Purificación de las proteínas de fusión con GST

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

de 1 mM. Las células se rompieron con tres pulsos de 10 s de ultrasonido en un procesador ultrasónico de alta intensidad (Vibra-cellTM VCX-600, Sonics & Materials). Finalmente, se separó la fracción soluble de la insoluble por centrifugación a 10000 x g durante 10 min. a 4°C.

La purificación de las proteínas recombinantes fusionadas a GST se llevó a cabo según el método desarrollado por Smith y Johnson (1988), con modificaciones descritas por Palena y col. (1998). El extracto proteico soluble obtenido se incubó en una columna de glutatión-agarosa (Sigma) previamente equilibrada en solución PBS [(pH 7,3) NaCl 150 mM; Na₂HPO₄ 16 mM; NaH₂PO₄ 1 mM]. Se emplearon aproximadamente 500 µl de una matriz de agarosa unida a glutatión para un volumen de medio de cultivo de partida de 100 ml. El extracto proteico se hizo recircular por la columna mantenida a 4°C durante 2 horas. Luego se lavó la columna con tres volúmenes de solución PBS y un volumen de Tris-HCl 50 mM pH 8,0. La elución de la proteína unida a la glutatión-agarosa se realizó empleando una solución de glutatión reducido (GSH) 10 mM en Tris-HCl 50 mM pH 8,0.

La pureza y concentración proteica de las alícuotas obtenidas fueron estimadas en geles de poliacrilamida con SDS teñidos con azul de Coomassie (ver punto 2.2.8.3).

2.2.8.7.3.2. Purificación de las proteínas de fusión con MBP

La expresión de las proteínas recombinantes fusionadas a la MBP se realizó en las mismas condiciones descritas para las proteínas de fusión a la GST (punto 2.2.8.7.3.1), exceptuando la utilización de solución amortiguadora de columna de amilosa (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM) para la resuspensión de las células, de acuerdo a lo recomendado por los fabricantes del sistema pMal (New England Biolabs). El extracto proteico soluble obtenido se incubó con 500 µl de una matriz de agarosa unida a amilosa (New England Biolabs) durante 4 horas con agitación suave a 4°C. La mezcla se vertió en una columna y se lavó varias veces con solución amortiguadora de columna de amilosa. Se empleó

maltosa 20 mM en la misma solución para realizar la elución. La pureza y concentración proteica de las alícuotas obtenidas fueron estimadas en geles de poliacrilamida con SDS teñidos con azul de Coomassie (ver punto 2.2.8.3).

2.2.9. Metodologías empleadas con plantas de *Arabidopsis thaliana*

2.2.9.1. Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*

El método utilizado para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* fue el de inmersión floral (*floral dip*), descrito por Clough y Bent (1998). Se prepararon aproximadamente 8 macetas con tierra para cada una de las construcciones a introducir en las plantas. Se sembraron alrededor de 20 semillas por pote, lo que permitió luego poder seleccionar las que mostraban un aspecto más saludable y reducir el número de plantas por maceta a 12. Las plantas se cultivaron en una cámara de temperatura, humedad y fotoperíodo controlados, según las condiciones de cultivo antes descritas, hasta la floración (aproximadamente 4 semanas). A partir de este momento, se empezaron a cortar las inflorescencias para aumentar el número de flores por planta a ser sometida al evento de transformación

Para preparar la suspensión de transformación se cultivaron células de *A. tumefaciens* previamente transformadas según el punto 2.2.5.2. Se realizó un preinóculo de 30 ml de medio LB suplementado con rifampicina 50 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml, en el caso de la cepa GV2260, y rifampicina 50 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml y estreptomycin 300 µg/ml para la cepa LBA4404. Este preinóculo se creció hasta saturación durante 24 horas a 28°C y una agitación de 160 rpm. Con este cultivo se inocularon 3 erlenmeyers con 200 ml de medio LB suplementado de la misma manera

que en el paso anterior, dejándose crecer los cultivos hasta llegar a la fase estacionaria (12-16 horas, a 28°C, con agitación). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5500 x g durante 20 min. Los sedimentos se resuspendieron cuidadosamente en 1 l de una solución de infiltración (sacarosa 5%), a la que se le adicionaron 300 µl del detergente *Silwet L-77* (OSI Specialties, Inc.) al momento de hacer la transformación. Esta suspensión de *Agrobacterium* se colocó en un vaso de precipitado sobre un agitador magnético de manera de lograr una agitación suave. Las plantas fueron sumergidas durante 30 seg tratando de evitar que el líquido entre en contacto con la tierra. Luego, los pots se ubicaron en forma horizontal en una bandeja, se taparon con nylon para conservar un ambiente húmedo y se llevaron a cámara de cultivo. A las 24-48 horas se colocaron en posición vertical y se les agregó abundante agua permitiendo que las plantas se desarrollaran hasta la formación y maduración de semillas (4-5 semanas aproximadamente para nuestras condiciones de cultivo).

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

2.2.9.2. Selección de las plantas de *Arabidopsis* transformadas

Una vez que las semillas estuvieron maduras, lo que se evidenció por el tono marrón-amarillento de las vainas que las contenían, las mismas fueron cosechadas o recuperadas para proceder a la identificación de transformantes. Una vez separadas de restos de material vegetal y tierra, se procedió al lavado y desinfección de las mismas. La desinfección consistió en realizar un primer lavado con etanol 70% (v/v) (1 min) y

luego con una solución de lavandina 5% y SDS 1% (15 min). Luego de este paso de desinfección, las semillas se lavaron 7 veces con agua destilada estéril y finalmente se resuspendieron en agar 0,1%. Una vez resuspendidas, las semillas se sembraron en placas de Petri de 150 mm con medio MS 0,5X, 0,8% agar, suplementado con vitaminas de Gamborg 1X y kanamicina 40 µg/ml, como agente selectivo. Las placas fueron mantenidas en la heladera durante tres días y luego fueron pasadas a cámara de cultivo, manteniéndose de esta forma durante 12-15 días. En ese período sólo las plantas transformadas generaron hojas verdaderas muy verdes y raíces suficientemente largas. Las plantas se dejaron crecer hasta la aparición de hojas y se transplantaron a potes con tierra. Cuando las rosetas alcanzaron un tamaño de 2 cm de diámetro, se recolectaron hojas para el análisis por PCR de las transformantes según se describe en 2.2.2. Cuando las semillas estuvieron maduras, éstas se recolectaron, rotularon y guardaron a 4°C.

2.2.9.3. Análisis de plantas de Arabidopsis transformadas

Con el objetivo de confirmar que las plantas resistentes al antibiótico usado para la selección de transformantes contengan la inserción de T-DNA y no correspondan a falsos positivos o “escapes”, se procedió al análisis de la presencia del transgén por PCR. Para ello se realizó una minipreparación de ADN genómico a partir de una o dos hojas de cada planta siguiendo el protocolo que se describe en el punto 2.2.6.2. El ADN obtenido fue utilizado como molde en una reacción de PCR. Para verificar la presencia de los transgenes en las plantas, se utilizó el oligonucleótido GUSNH₂ (ver anexo I) y un oligonucleótido específico según la secuencia del fragmento analizado, en el caso del

estudio de las regiones promotoras, y oligonucleótidos específicos en el caso de las plantas que sobreexpresan *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM*. Las plantas que dieron resultado positivo en la reacción de PCR se dejaron crecer hasta maduración de las vainas, se colectaron las semillas y éstas se sembraron en tierra. Las semillas de estas plantas (T2) y de la generación siguiente (T3), se utilizaron para los estudios realizados posteriormente.

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

2.2.9.4.1. Análisis histoquímico de la actividad β -glucuronidasa

Para analizar la actividad β -glucuronidasa en forma histoquímica en las plantas transformadas, plántulas u órganos aislados fueron lavados con solución de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0) durante algunos minutos, para eliminar restos de tierra o medio de cultivo, y luego transferidos a una solución de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0), Tritón X-100 0,1% y X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucurónido) 2 mM (ver anexo II). A continuación, se sometieron a vacío durante 5 min y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 2-16 horas (Jefferson, y col., 1987). Luego de la incubación se fijaron en una solución de formaldehído 10% (v/v), etanol 20% (v/v) y ácido acético 5% (v/v) durante 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el fijador, se agregó etanol 70% para decolorar los tejidos y se mantuvo en solución etanólica a 4°C. Las imágenes digitalizadas se tomaron con una cámara COOLPIX995 digital de Nikon sobre microscopio óptico y se procesaron con el software Adobe Photoshop 7.0.

El análisis histoquímico se realizó en plántulas de 0 a 15 días crecidas en placas de Petri con medio MS 0,5X, 0,8% agar, y en órganos (hojas, tallos, flores, vainas y raíces) de plantas adultas crecidas en macetas con tierra según se describió anteriormente.

2.2.9.4.2. Análisis fluorométrico de la actividad β -glucuronidasa en plantas transformadas

Los ensayos fluorométricos se realizaron en extractos de plántulas de 7-15 días crecidas en placas de Petri con medio MS-agar y de órganos (hojas, tallos, flores, vainas y raíces) de plantas adultas crecidas en macetas con tierra. En todos los ensayos se utilizaron como controles plantas transformadas con el plásmido pBI101.3 (Jefferson y col., 1987) y plantas transformadas con el plásmido pBI121.

Se cultivaron las semillas de las líneas positivas según el análisis por PCR de plantas transformadas en placas de Petri con medio MS-agar. Las placas se dejaron 48-72 horas a 4°C y posteriormente se mantuvieron en cámara de cultivo durante 15 días. Las plántulas/órganos de 3 líneas independientes se procesaron con mortero hasta obtener un polvo fino, se agregaron luego 200 μ l a 500 μ l de solución amortiguadora de extracción [fosfato de sodio 50 mM pH 7,0; EDTA 10 mM pH 8,0; SDS 0,1% (p/v); β -mercaptoetanol 10 mM; Tritón X-100 1% (v/v)]. La mezcla se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 13000 x g durante 10 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se mantuvo en baño de hielo.

La reacción fluorométrica se realizó según el método de Jefferson y col. (1987). Se agregaron 10 a 20 μ g de extracto proteico a una solución de reacción [solución

amortiguadora de extracción suplementada con el sustrato MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido) 1 mM y metanol 40% (v/v)] en un volumen final de 200 μ l y se incubó a 37°C en baño de agua durante 10 min. La reacción enzimática se detuvo agregando 800 μ l de Na₂CO₃ 0,2 M. Los valores de medidas fluorométricas se expresaron en pmoles de MU (4-metilumbeliferona).min⁻¹.(mg de proteínas totales)⁻¹ de acuerdo a una curva patrón de RFU (unidades de fluorescencia relativa) vs concentración de producto 4-MU. Las medidas fluorométricas se realizaron en un equipo *VersaFluor™ Fluorometer System* de Bio-Rad (filtros EM 460/10 y EX 360/40) en cubetas de 1 ml.

2.2.9.5. Ensayos del efecto de distintos compuestos sobre la expresión del gen reportero en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Se realizaron tratamientos con diferentes compuestos en plántulas transgénicas de *Arabidopsis*. Los agentes ensayados y las concentraciones finales de los mismos en el medio se indican en la siguiente tabla.

<i>Agente</i>	<i>Concentración final</i>
Sacarosa	3% (p/v)
Manitol (azúcar no metabolizable)	3% (p/v)
6-bencilaminopurina (citoquinina)	0,1 mM
Ácido abscísico	0,1 mM
Ácido amino-ciclopropano carboxílico (precursor de etileno)	0,1 mM
Ácido giberélico (giberelina)	0,1 mM

Ácido indolacético (auxina)	0,1 mM
Ácido jasmónico	0,1 mM
Fosfato	10 mM
Peróxido de hidrógeno	10 mM
Ácido salicílico	0,1 mM
Cloruro de sodio	0,25 mM
UV-B	

A excepción de los tratamientos con sacarosa y manitol, los cuales se realizaron creciendo las plántulas en placas con medio MS suplementado con estos compuestos, las plantas transformadas con las diferentes construcciones fueron sembradas en medio MS-agar (ver punto 2.1.1.3) suplementado con el antibiótico kanamicina 50 µg/ml. Las placas se mantuvieron entre dos y tres semanas en cámara de cultivo. Luego de transcurrido el tiempo necesario para la selección, se humectó el medio de cultivo con agua destilada estéril y se extrajeron cuidadosamente las plantas de modo de no dañar las raíces. Posteriormente se sumergieron las raíces de unas 10 plántulas en cada solución y finalmente se realizó el análisis por medida del gen reportero mediante la técnica fluorométrica (ver punto 2.2.9.4.2).

2.2.9.6. Ensayo de transformación transiente de plantas de *Arabidopsis thaliana*

La transformación transiente de plantas de *Arabidopsis* fue realizada de acuerdo al método propuesto por Li y Nebenführ (2009), con algunas modificaciones. Las cepas

de *Agrobacterium tumefaciens* fueron crecidas en medio LB suplementado con los correspondientes antibióticos. Luego, fueron cosechadas y el sedimento celular se lavó con una solución que contenía MgCl₂ 10mM y acetosyringona 100 µM. Por otra parte, las plantas transgénicas que contenían las regiones promotoras estudiadas, de 6 días de desarrollo y crecidas en placa con medio MS suplementado con sacarosa 1%, fueron sumergidas en una solución de co-cultivo compuesta por medio MS, sacarosa 1%, acetosyringona 100µM, Silwet L-77 0,005% y el cultivo de *Agrobacterium* a una DO₆₀₀ de 0,5. Se incubó en oscuridad a una temperatura comprendida entre 23°C y 26°C durante 36 horas. Luego, se realizaron cinco lavados con agua destilada y posteriormente se llevaron a cabo ensayos de actividad mediante histoquímica y fluorimetría como se describe en los puntos 2.2.9.4.1 y 2.2.9.4.2, respectivamente.

ANEXO I

Tabla de oligonucleótidos utilizados para generar las distintas construcciones para el análisis de las regiones promotoras de los genes en estudio

Nombre	Secuencia en sentido 5' - 3'	Sitio de restricción
COX6aF	CGGGTCGACACGCGTTGGTATTTTGGAA	<i>SalI</i>
COX6aR	GCGGGATCCTTTCCGGGATCTTCCTG	<i>BamHI</i>
COX6b-1F	GGCGTCGACAAGGTGATTAGAGAAATGA	<i>SalI</i>
COX6b-1R	GGCGGATCCTGAAAGTGTGTGGTCAAA	<i>BamHI</i>
COX6b-2F	CCCCTCGACGAAAGAAAGCTCTCTCTC	<i>SalI</i>
COX6b-2R	GGCGGATCCGGCTGATCTGATCAATGAAT	<i>BamHI</i>
COX6b-3F	GGCGTCGACCAAGAATTGAGTCCAATGATTA	<i>SalI</i>
COX6b-3R	GGCGGATCCGGCTGATCTGAAATGAATG	<i>BamHI</i>
COXaACORT1F	GGCGTCGACTGTGTGGTTTTTAGAGGT	<i>SalI</i>
COX6aACORT2F	GGCGTCGACACTGAAAATTGGATTCAAAG	<i>SalI</i>
COX6aACORT3F	GGCGTCGACTTAGGAGATGACATATGG	<i>SalI</i>
COX6aACORT4F	GGCGTCGACAGATACGAATCCTTTGTTG	<i>SalI</i>
COX6a.1	CGGGTCGACGATAAGAAAACAAAACAATGA	<i>SalI</i>
COX6b-1ACORT1F	GGCGTCGACAGTCCTTTTATCTTCATTTG	<i>SalI</i>
COX6b-1ACORT2F	GGCGTCGACATTATATATGGTGTGAATCG	<i>SalI</i>
COX6b1.1	GGCGTCGACTTATCTGATCAGTGGAGA	<i>SalI</i>
COX6b2.1	GGCGTCGACAATCTAAAATCACATAAACAAA	<i>SalI</i>
COX6b-3ACORT1F	GGCGTCGACCAGAAGAGTGAGACACAA	<i>SalI</i>
COX6b-3ACORT2F	GGCGTCGACAGAGATCAAACAATTATGAAT	<i>SalI</i>
COX6b3.1F	GGCGTCGACGTTTAAACTGTAAAGTGAAC	<i>SalI</i>
COX6b1/1F	CCAGATAGACTTGGTCTCCGATCCAGT	---
COX6b1/1R	GAGACCAAGTCTATCTGGCTATGTCCTT	---
COX6b1/2	GCGGGATCCAATCTTTTGATGATAACAC	<i>BamHI</i>
COX6b1/3R	CAGGATCTCTGGGCTGTTTTACTAAG	---
COX6b1/3F	ACAGGCCAGAGATCCTGGAGAAAGC	---
PromotorMagoF	GCCGTCGACAATTTTTTTGAAGGATACAC	<i>SalI</i>
PromotorMagoR	GCCGGATCCGCCTTCTTTTTTTCTTT	<i>BamHI</i>

PromotorY14F	GCCGTCGACAGTCAGGACCAAAAAGCAA	<i>Sall</i>
PromotorY14R	GCCTCTAGAGACTTCCGCCCGTAAG	<i>XbaI</i>
PromotorPymF	GCGCTCGAGATCAGAATAGTAGGAGTA	<i>XhoI</i>
PromotorPymR	GCGCTAGACTGAGTCCTTCAACTTTT	<i>XbaI</i>
pMagoAcortF	GCGGTGCGACTCGTGCATTGACTTGAGA	<i>Sall</i>
PY14AcortF	GCGGTGCGACTATCCTAATTATGAAGT	<i>Sall</i>
pPymDelIF	TCTCCGTAGTATACTTGATAGCTGAGG	---
pPymDelIR	TCAAGTATACTACGGAGATGGTGGCTA	---
PpymDelE1AF	GAAGAAGAATAGGTCAGCTTTCTTTTTT	---
PpymDelE1AR	GCTGACCTATTCTTCTTTCTAAAGTA	---
PPymDel5'UTR	GCGTCTAGATTCTTCTTTCTAAAG	<i>XbaI</i>

Tabla de oligonucleótidos utilizados para mutagenizar los elementos *site II* en las regiones promotoras estudiadas

Nombre	Secuencia en sentido 5' - 3'	Sitio de restricción
6aMUTIIF	TAAAATAGAACATAAAAAGGAACATTAACCTTG	---
6aMUTIIR	CTTTATGTTCTATTTAGTTCATCATTG	---
6b1MUTIIF	AAGCGGACTTAGTAAAACAGGAACAAATTAT	---
6b1MUTIIR	GTTTTACTAAGTCCGCTTTAGGAACAATAAGC	---
6b2MUTIIF	CATTAAGAACAATAAAAATGAACTATTCG	---
6b2MUTIIR	TTTTATTGTTCTTTAATGGTACCAAAAATTAAG	---
6b3MUTIIF	AACATTAGTATTGGAGAACAACAATG	---
6b3MUTIIR	TTCTCCAATACTAATGTTCCCTAAGTT	---
Magomut1F	AACTAAAAGTTCCTTAACCTTTTC	---
Magomut1R	AAAAGTTAAGGAACAGTTTTAGTTT	---
Magomut2F	GGAACAATATGTAAGAACATTACCTTTT	---
Magomut2R	TGTTCTTACATATTGTTCCAGAACCCAT	---
Y14mut1F	AGAACAAAATAAGAACACTAACATTG	---
Y14mut1R	GTGTTCTTATTTGTTCTTACTTTT	---
Y14mut2F	AGAACAAAATAAGAACACTTAAGGTC	---
Y14mut2R	TGTTCTTATTTGTTCTTTTACGCTT	---

Nombre	Secuencia en sentido 5' - 3'	Sitio de restricción
6b1MUTSACF	AAGCGGACTTGAGAAAACAGGCC	---
6b1MUTSACR	GGCCTGTTTTCTCAAGTCCGCTT	---
6b2MUTSAC1F	TGTTATATTTAATGAGAAAGATCTATCA	---
6b2MUTSAC1R	TGATAGATCTTTCTCATTAATATAACA	---
6b2MUTSAC2F	TTTTATATTTAATGAGAAAGACATATTG	---
6b2MUTSAC2R	CAATATGTCTTTCTCATTAATATAAAA	---
6b3MUTSACF	TAGGCCATTGAGATTGGAGCCCA	---
6b3MUTSACR	TGGGCTCCAATCTCAATGGGCCTA	---

Tabla de oligonucleótidos utilizados para mutagenizar los elementos SURE en las regiones promotoras de los genes *AtCOX6b*

Nombre	Secuencia en sentido 5' - 3'	Sitio de restricción
Pymmut1F	AGAGAGACAGGTTCAAAAAAAGGA	---
Pymmut1R	TCCTTTTTTTGAACCTGTCTCTCT	---
Pymmut2F	GATATCTCGTGTCTTAACGCTTG	---
Pymmut2R	CAAGCGTTAAGAACACGAGATATC	---

Tabla de oligonucleótidos utilizados para generar clones de ADNc de los genes *Atmago*, *AtY14* y *Atpym* a fin de utilizarlos en la transformación de *Arabidopsis thaliana*

Nombre	Secuencia en sentido 5' - 3'	Sitio de restricción
cDNAMagoF	GCCGATCCAAGGCATGGCCGCGGAAG	<i>Bam</i> HI
cDNAMagoR	GCCGTCGACCTAGATAGGCTTGATTTTGAAG	<i>Sal</i> I
cDNAY14F	GCCTCTAGAAAGTCATGGCGAACATAGA	<i>Xba</i> I
cDNAY14R	GCCGAGCTCTCAGTAACGTCTTCTCGG	<i>Sac</i> I
cDNAPymF	GCGTCTAGACTCAGATGGGAAGCAGAA	<i>Xba</i> I
cDNAPymR	GCGGAGCTCTTAAGCCGCTTATCCTC	<i>Sac</i> I

Tabla de oligonucleótidos utilizados para generar clones de ADNc de los genes *Atmago*, *AtY14* y *Atpym* para la expresión de los mismos como proteínas de fusión a GST o MBP

Nombre	Secuencia en sentido 5' - 3'	Sitio de restricción
Mago-pGEXF	GCCGGATCCGCATGGCCGCGGAAGAA	<i>Bam</i> HI
Mago-pGEXR	GGCGAATTCCTAGATAGGCTTGATTTTGA	<i>Eco</i> RI
Y14-pGEXF	GCCGGATCCTCATGGCGAACATAGAATCAG	<i>Bam</i> HI
Y14-pGEXR	GGCGAATTCTCAGTAACGTCTTCTCGGACT	<i>Eco</i> RI
Pym-pMALF	CGCGAATTCACTCAGATGGGAAGCAGA	<i>Eco</i> RI
Pym-pMALR	GCGCTGCAGTTAAGCCGCTTATCCTC	<i>Pst</i> I

Otros oligonucleótidos empleados

Nombre	Secuencia en sentido 5' - 3'	Sitio de restricción
dT _v	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV (V=A, C o G)	---
Actin-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	---
Actin-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC	---
GUS-NH ₂	TTGGGGTTTCTACAGGAC	---
pPymBS-F	GAATTCTTTCGTTCCGGAGAGAGAG	<i>Eco</i> RI
pPymBS-R	GGATCCGACAATGTCACACGTCGA	<i>Bam</i> HI
PYMsonda	CAAATAATGATGTATGTGGGG	---

ANEXO II

Composición de las soluciones o medios de cultivo utilizados

Medio Murashige y Skoog: KNO₃ 1,9 g/l; NH₄NO₃ 1,65 g/l; CaCl₂·2H₂O 0,44 g/l; MgSO₄·7H₂O 0,37 g/l; KH₂PO₄ 0,17 g/l; Na₂EDTA 37,3 mg/l; FeSO₄·7H₂O 27,8 mg/l; MnSO₄·4H₂O 22,3 mg/l; H₃BO₃ 6,2 mg/l; ZnSO₄·4H₂O 8,6 mg/l; KI 0,83 mg/l; Na₂MoO₄·2H₂O 0,25 mg/l; CuSO₄·5H₂O 0,025 mg/l; CoCl₂·6H₂O 0,025 mg/l. Se ajusta el pH a 5,8 con NaOH 1 M. Para medios sólidos se añade 8 g/l de agar

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

Medio de cultivo Luria-Bertani (LB): Peptona de carne 10 g/l; NaCl 5 g/l; extracto de levadura 5 g/l. Para preparar medio LB sólido se agrega agar al 1,5% (p/v)

TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,5)

Solución de SSC 1X: NaCl 0,15 M; citrato de sodio 0,015 M

Solución de desnaturalización para membranas de nylon: NaOH 0,2 N; NaCl 1,5 M

Solución de neutralización para membranas de nylon: Tris-HCl 0,4 M (pH 7,6); SSC 2x

Solución de Miniprep I: Tris-HCl 25 mM (pH 8,0); glucosa 50 mM y EDTA 10 mM

Solución de Miniprep II: NaOH 0,2 N y SDS 0,1% (p/v)

Solución amortiguadora de extracción de ADN de *Arabidopsis* para minipreparación: Tris-HCl 200 mM (pH 8,0); NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%

Solución amortiguadora de extracción de ARN de *Arabidopsis*: Tris-HCl 200 mM (pH 9,0); LiCl 0,4 M; EDTA 25 mM; SDS 1%

Solución TBE 1X: Tris-HCl 89 mM (pH 8,0); ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM (pH 8,0).

Solución TAE 1X: Tris-acetato 40 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM

Solución de siembra de ADN y ARN en geles de agarosa: Azul de bromofenol 0,25% (p/v); xilencianol FF 0,25% (p/v); glicerol 30% (v/v)

Solución de Denhardt 100X: Polivinilpirrolidona 2% (p/v); albúmina sérica bovina 2% (p/v); Ficoll 2% (p/v)

Solución de OLB: Tris-HCl 0,25 M (pH 8,0); MgCl₂ 50 mM; HEPES 1 M (pH 6,6); dCTP 1mM; dGTP 1 mM; dTTP 1mM; β-mercaptoetanol 65 mM y 350 ng de hexanucleótidos de secuencia al azar (dN₆)

Mezcla de soluciones patrones A, B y C en una relación 1:2,5:1,5

Solución A: 1 ml de solución O (Tris-HCl 1,25 M (pH 8,0); MgCl₂ 0,125 M); 18 μl β – mercaptoetanol; 5 μl dATP; 5 μl dCTP; 5 μl dTTP (0,1M c/u)

Solución B: Hepes 2M (pH 6,6)

Solución C: Hexanucleótidos de secuencia al azar (dN₆) de concentración 90 DO/ml

Solución amortiguadora de extracción de proteínas para ensayo fluorométrico de actividad β-glucuronidasa: Na₂HPO₄ 50 mM (pH 7,0); EDTA 10 mM (pH 8,0); SDS 0,1%; β-mercaptoetanol 10 mM; Tritón X-100 1%

Solución amortiguadora de extracción de proteínas para ensayo de Western blot: K₃(PO₄)₃ (50mM), tritón X-100 (0,001%), PVP-40 insoluble (1%), EDTA 2mM

Solución de homogeneización para preparación de extractos proteicos nucleares de inflorescencia de coliflor: sacarosa 250 mM; NaCl 10 mM; Pipes 25 mM pH 7,0; EDTA 5 mM pH 8,0; MgCl₂ 10 mM; β-mercaptoetanol 20 mM; Tritón X-100 0,1 % (v/v); PMSF 0,2 mM

Solución de almacenamiento empleada en la preparación de extractos proteicos nucleares de inflorescencias de coliflor:: Hepes 50 mM pH 7,6; NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM; KCl 10 mM; Glicerol 50% (v/v); DTT 1 mM; PMSF 0,2

Solución de diálisis: NaCl 40 mM; Hepes 20 mM pH 7,6; EDTA 0,2 mM; Glicerol 20% (v/v); DTT 1 mM; PMSF 0,2

Solución amortiguadora empleada en el ensayo de fosforilación *in vitro* de proteínas recombinantes: Tris-HCl pH 7,2 (20mM); MgCl₂ (5mM); CaCl₂ (0,5 mM); DTT (2 mM)

Solución amortiguadora empleada en el ensayo de retardo en geles: HEPES 20 mM pH 7,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 2 mM; EDTA 0,5 mM; DTT 1 mM; Triton X-100 0,5% (p/v); glicerol 10% (v/v), poli (dI-dC) 1,5 µg; y BSA 22 ng/µl

LAEMMLI 1X: Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% (p/v). (pH 8,3).

Solución de siembra para proteínas en geles desnaturalizantes: Tris-HCl 10 mM (pH 7,0); EDTA 2 mM (pH 8); SDS 2% (p/v); β-mercaptoetanol 0,5% (p/v); azul de bromofenol 0,5 mg/ml.

Solución colorante de geles de proteínas: Coomasie Brilliant BLue R-250 1% (p/v) en una mezcla de etanol:acético:agua 50:10:40.

Solución decolorante de geles de proteínas: mezcla etanol:ácido acético: agua 25:10:65.

Solución amortiguadora Tris-glicina: Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM. (pH 8.3)

Solución de siembra para proteínas en geles nativos: Tris-HCl 63 mM (pH 6,8); glicerol 10% (p/v); azul de bromofenol 0,1 mg/ml.

Solución de transferencia: Tris 48 mM; glicina 39 mM; metanol 20% (v/v)

Solución bloqueante: leche descremada 5% (p/v) en PBS 1X

Solución de TBS 1X: Tris 20 mM (pH 7,6); NaCl 0,9% (p/v)

Solución madre de X-gluc: X-Gluc 50 mM en N-N-dimetilformamida

4.1 ESTUDIOS FUNCIONALES DE LAS REGIONES PROMOTORAS DE LOS GENES *ATCOX6A*, *ATCOX6B-1*, *ATCOX6B-2* Y *ATCOX6B-3* DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

4.1.1 Introducción

El estudio de las regiones promotoras reviste gran importancia cuando se desea conocer con precisión el patrón espacial y temporal de expresión de él o los genes analizados. Asimismo, permite identificar y determinar la posible función de elementos reguladores a nivel transcripcional, ya sean novedosos o previamente reportados.

En este sentido, la metodología de transformación estable de plantas de *Arabidopsis thaliana* por medio de la infección con *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent, 1998) ha impulsado en gran medida este tipo de estudios en plantas. La transferencia de genes mediada por infiltración con *Agrobacterium* es relativamente simple y logra patrones de integración de ADN que permiten la obtención de información en tiempos razonables. El análisis histoquímico y fluorométrico de las plantas transformadas en forma estable, que contienen las regiones promotoras de interés fusionadas al gen reportero *gus*, son algunas de las técnicas más ampliamente empleadas, generalmente complementadas con la correspondiente determinación de transcritos (Jefferson, 1987).

En el presente capítulo, se detallan y discuten los resultados obtenidos a partir del estudio de las secuencias promotoras de los genes que codifican subunidades del complejo citocromo *c* oxidasa de *Arabidopsis thaliana*: *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3*.

Escaso es el conocimiento que se tiene acerca de la estructura y función de los genes *cox6* de plantas, encontrándose tan sólo unos pocos antecedentes en arroz (Ohtsu y col., 1999; Ohtsu y col., 2001).

La idea de una posible coordinación en la expresión de los componentes que constituyen los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (Welchen y González,

2005; Welchen y González, 2006) despertó nuestro interés en dilucidar si los genes *AtCOX6* son regulados o no por un mecanismo de expresión común entre ellos y con el resto de genes de proteínas que constituyen el complejo IV.

Antes de comenzar con la descripción de los resultados obtenidos en el presente capítulo, resulta conveniente aclarar que en las bases de datos de acceso público se establece la presencia de cuatro genes *AtCOX6b*. El cuarto gen, *AtCOX6b-4* (At1g32710), no fue tenido en cuenta en el presente estudio, debido a que el transcrito de este gen no ha podido ser detectado, sugiriendo por lo tanto que se trataría de un pseudogen.

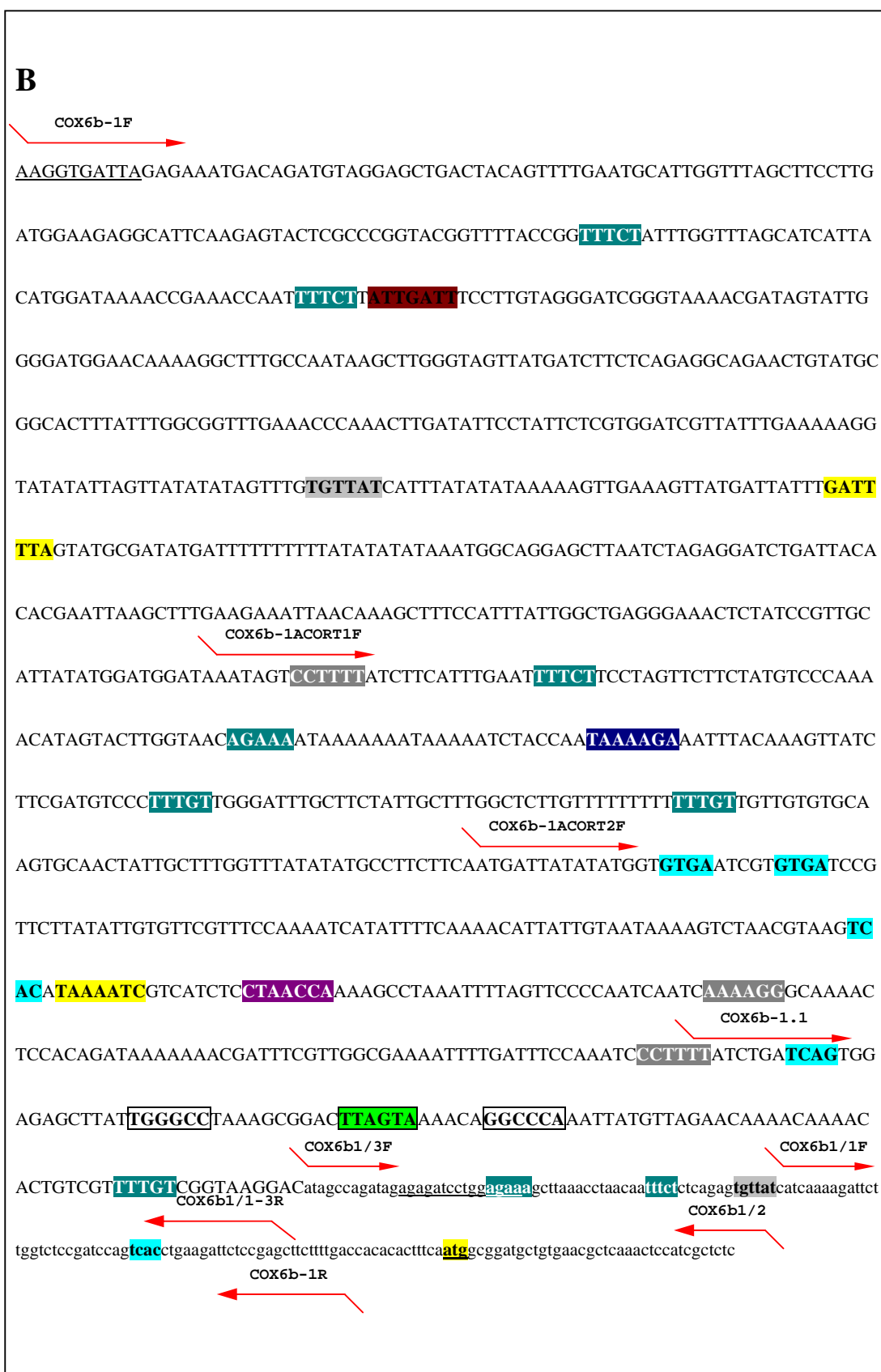
4.1.2 Resultados

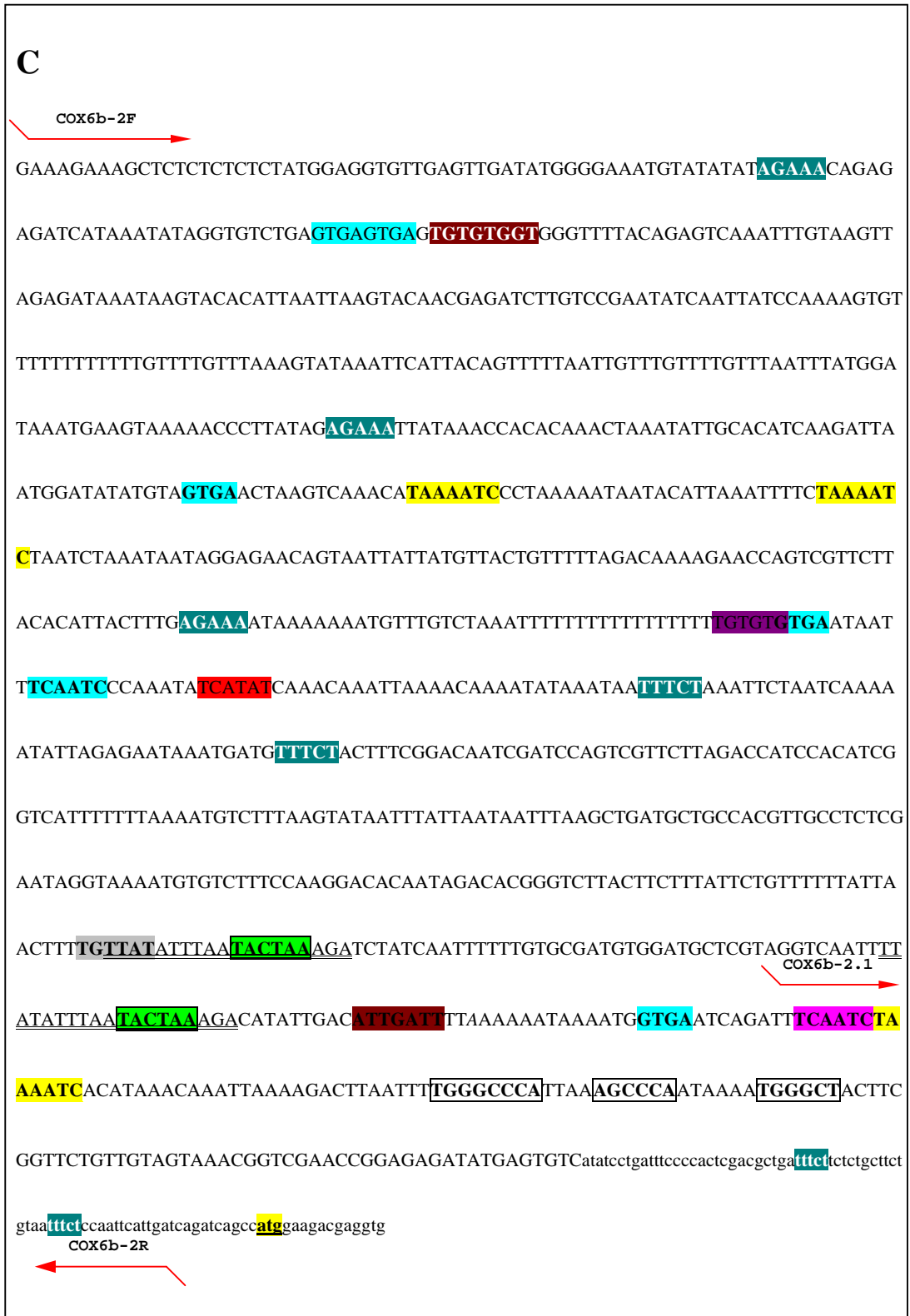
4.1.2.1 Análisis de las secuencias promotoras de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3*

4.1.2.1.1 Búsqueda de elementos transcripcionales putativos en las secuencias promotoras de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3*

Por medio de bases de datos y servidores de acceso público, es posible determinar, en una secuencia de ADN de interés, la presencia de elementos reguladores putativos de la expresión génica, previamente reportados. Por tal motivo, nuestro primer paso consistió en intentar identificar “motivos” únicos o compartidos en las regiones promotoras de los genes *AtCOX6*. De esta manera, empleando diferentes bases de datos (http://www.bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/BAR_Promomer.cgi; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/> y <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/>), se lograron identificar en cada una de las regiones promotoras estudiadas los elementos resaltados en la figura 8, los que serán luego analizados detalladamente.







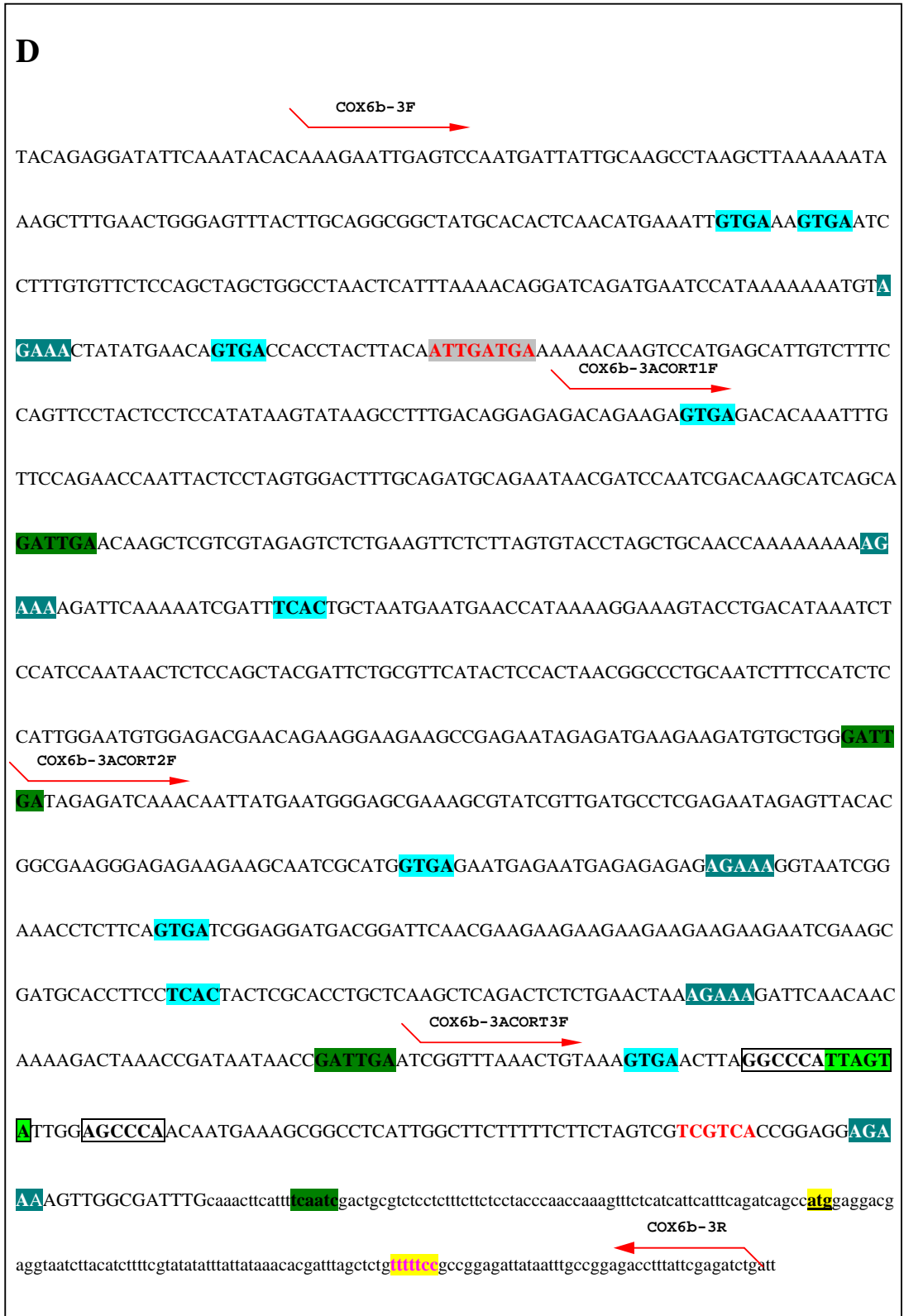


Figura 8: Secuencias nucleotídicas de los fragmentos clonados de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3*. Las regiones promotoras putativas se indican en mayúsculas, las regiones 5'UTR de cada gen se indican en minúsculas. Las flechas en color rojo señalan los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de ADN clonados en las construcciones pBI-*AtCOX6a* (A), pBI-*AtCOX6b-1* (B), pBI-*AtCOX6b-2* (C) y pBI-*AtCOX6b-3* (D), que se describen más adelante. Asimismo, se señalan los oligonucleótidos específicos empleados para realizar los acortamientos correspondientes de cada promotor. Con diferentes colores se resaltan los “elementos transcripcionales” identificados en cada secuencia a partir de la búsqueda en bases de datos. En negrita, resaltado en amarillo y subrayado se indica el sitio de inicio de la traducción (ATG) en cada gen.

A continuación se resumen los elementos *cis* identificados en las regiones promotoras en estudio junto con una breve descripción de los mismos.

Elemento (secuencia)	Descripción	Referencia
5'-GTGA-3'	Motivo involucrado en la expresión en granos de polen en el gen <i>lat56</i> de tomate.	Rogers, H. J. y col., (2001)
5'-AGAAA-3'	Motivo involucrado en la expresión en granos de polen en el gen <i>lat52</i> de tomate.	Bate, N. y Twell, D., (1998)
5'-CCTTTT-3'	“Pyrimidine Box”, elemento de respuesta a giberelinas en el gen α -amilasa de arroz.	Mena, M. Y col., (2002).
5'-GATTGA-3'	Elemento de respuesta a citoquininas en el gen hidroxipiruvato reductasa de <i>Cucumis sativus</i> .	Jin, G. y col., (1998)
5'-ATTGATGA-3'	Elemento de respuesta a ácido salicílico en <i>Arabidopsis thaliana</i>	Kang, H. y Singh, K. B., (2000)
5'-GATTTTA-3'	Elemento de respuesta a la luz en <i>Pisum sativum</i> .	Nagano, Y. Y col., (2001)
5'-TACTAA-3'	“Core” del elemento de respuesta a sacarosa en el gen <i>patatin</i> de papa.	Grierson, C. y col., 1994
5'-TGGGCC/T-3'	Elemento <i>site II</i> involucrado en la expresión del gen <i>pcna</i> de arroz, en las regiones meristemáticas.	Kosugi, S. Y col., (1995)
5'-TGTGTGGTT-3'	Elemento de respuesta a la luz en tabaco.	Lam, E. y Chua, N.H., (1990).

Tabla N° 3: Elementos transcripcionales putativos identificados en las regiones promotoras de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3*, empleando las bases de datos de acceso público.

4.1.2.1.2 Alineamiento de las regiones promotoras analizadas

A partir de la búsqueda de elementos reguladores transcripcionales en las regiones promotoras analizadas se pudo detectar la presencia de “motivos” comunes en las cuatro secuencias estudiadas. Esto despertó nuestro interés en determinar el nivel de similitud entre las mismas. Por tal motivo, empleando el algoritmo ClustalW disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, se procedió a realizar un apilamiento de estas secuencias. Los niveles de identidad entre ellas se resumen en el siguiente cuadro:

	<i>pAtCOX6a</i>	<i>pAtCOX6b-1</i>	<i>pAtCOX6b-2</i>	<i>pAtCOX6b-3</i>
<i>pAtCOX6a</i>	100%	11%	4%	5%
<i>pAtCOX6b-1</i>	11%	100%	1%	4%
<i>pAtCOX6b-2</i>	4%	1%	100%	9%
<i>pAtCOX6b-3</i>	5%	4%	9%	100%

Tabla N° 4: Porcentajes de identidad entre las regiones promotoras analizadas empleando el algoritmo ClustalW.

Del alineamiento de las secuencias promotoras se deduce que existe un bajo porcentaje de identidad entre las mismas. Este resultado no resulta sorprendente si se tiene en cuenta que en general estas regiones génicas son poco conservadas, salvo en casos en que los genes se hayan originado por duplicaciones muy recientes. Esto refuerza la idea de que la presencia de elementos regulatorios comunes podría tener un significado funcional en la coordinación de la expresión de estos genes.

4.1.2.2 Clonado de las secuencias promotoras de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3* en pBI101.3

A partir del conocimiento previo acerca de las regiones promotoras de genes de *Arabidopsis* y la localización de elementos transcripcionales relevantes en las mismas, se realizó la amplificación de las secuencias promotoras correspondientes a los genes de interés, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.1.1 de Materiales y Métodos.

De esta manera, se purificaron fragmentos de ADN de 1000 pb, 1262 pb, 1155 pb y 1162 pb correspondientes a los promotores putativos de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3* respectivamente, que incluían las regiones 5'UTR completas en todos los casos. Dichos fragmentos fueron digeridos con las enzimas *SalI* y *BamHI*, como se describe en el apartado 2.2.3, y ligados al vector pBI101.3 (ver punto 2.2.4), previamente digerido con las mismas enzimas. Los vectores obtenidos de esta manera fueron denominados: pBI-*AtCOX6a*, pBI-*AtCOX6b-1*, pBI-*AtCOX6b-2* y pBI-*AtCOX6b-3* y se esquematizan en la figura 10. Las construcciones fueron utilizadas para obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, empleando el método de transformación “*floral dip*” descrito en el apartado 2.2.9.1.

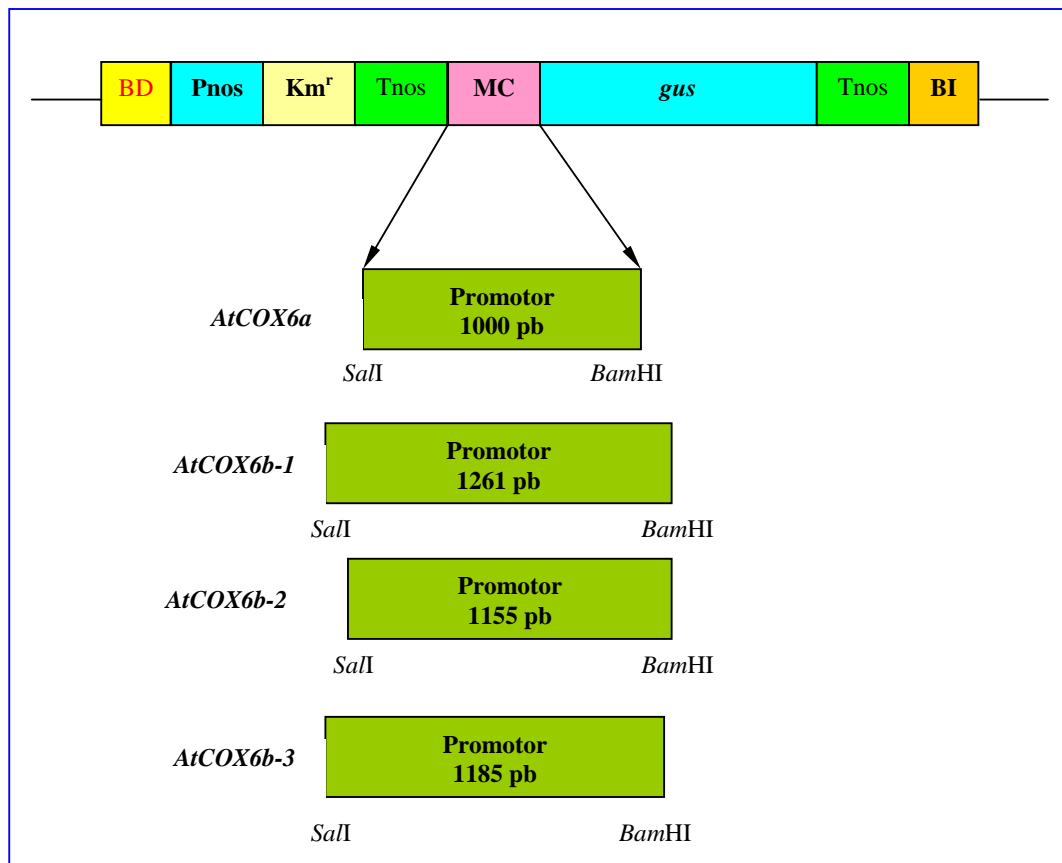


Figura 10: Esquema de la región correspondiente al ADN-T de las construcciones que contienen las secuencias promotoras de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3* de *Arabidopsis thaliana* en el vector pBI101.3, **BD** y **BI**: bordes derecho e izquierdo, **Pnos**: promotor del gen de la Nopalina Sintetasa, **Tnos**: secuencia terminadora del gen de la Nopalina Sintetasa, **Km^r**: gen de resistencia a kanamicina, **MC**: secuencia múltiple de

clonado del vector pBIN19 con sitios para endonucleasas de restricción semejantes a los del vector pUC19, *gus*: región codificante del gen de la β -glucuronidasa.

4.1.2.3 Análisis de las plantas transgénicas

4.1.2.3.1 Selección y análisis de las plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas

Las semillas de las plantas transformadas fueron sometidas a un proceso de selección con el antibiótico kanamicina como se describe en el apartado 2.2.9.2 de Materiales y Métodos. Las plantas sobrevivientes fueron transplantadas a tierra y en unas 15 de ellas se procedió a verificar la presencia del transgén por PCR. La tercera filial (y subsiguientes) de aquellas plantas que resultaron positivas en este análisis se emplearon para los estudios histoquímicos y fluorométricos que se detallan a continuación.

4.1.2.3.2 Análisis histoquímico de expresión del gen *gus* en plantas transformadas

4.1.2.3.2.1 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6a

Se procedió a realizar la detección de la expresión del gen reportero *gus* en plántulas de *Arabidopsis* siguiendo la metodología descrita en el punto 2.2.9.4.1. El patrón de tinción obtenido con las plantas que contenían la construcción pBI-AtCOX6a se ilustra en la figura 11. Como se puede observar, la expresión del gen reportero bajo el comando de la región promotora del gen *AtCOX6a* no se detectó en ningún órgano analizado en plántulas (desde la 24 horas hasta los 15 días, figura 11 A-C). El seguimiento histoquímico realizado en órganos de plantas adultas evidenció expresión exclusivamente en granos de polen (figura 11 D-I). Resulta conveniente mencionar que los controles de plantas no transformadas o transformadas con el vector pBI101.3 no

mostraron actividad GUS en ninguno de los estadios de desarrollo analizados (resultados no mostrados).

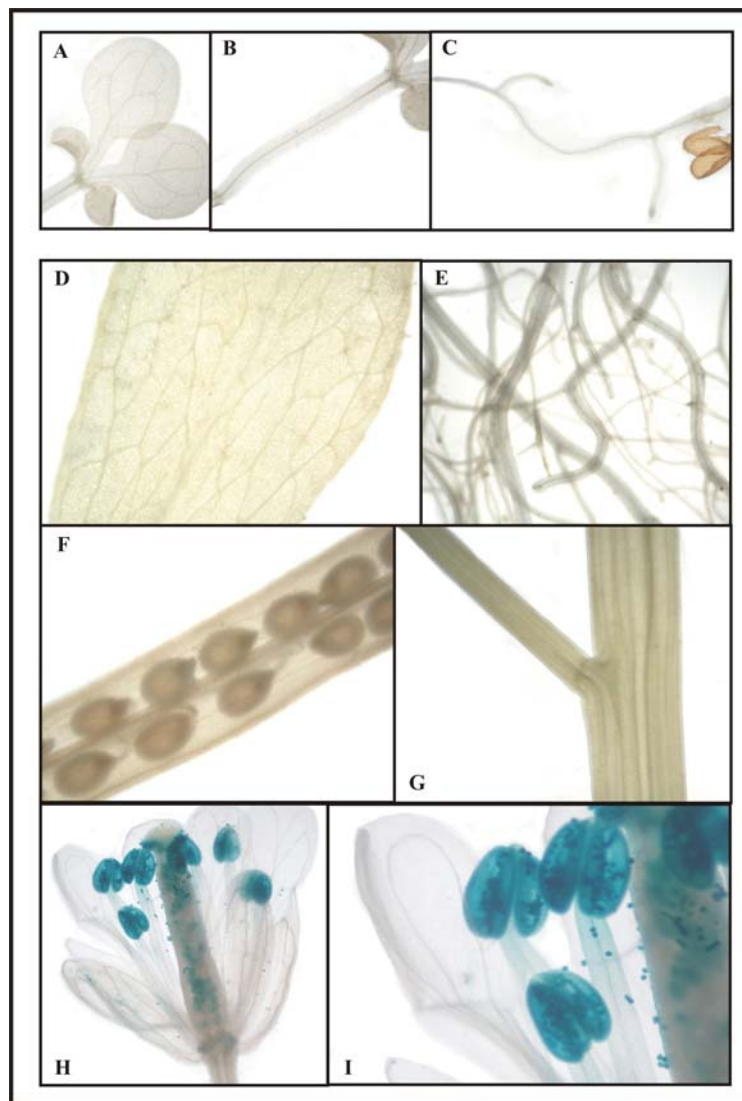


Figura 11: Expresión histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtCOX6a. Las plántulas fueron crecidas en placas de Petri con medio M-S agar con kanamicina. Cumplidos los distintos períodos de desarrollo, las plántulas fueron cosechadas y sometidas a ensayos histoquímicos de actividad GUS. En plántulas de 10 días, A) detalle de los cotiledones; B) hipocotilo ; C) raíz. En plantas adultas, D) detalle de la hoja; E) raíz; F) detalle de la vaina; G) tallo; H) flor; I) anteras. Las fotografías fueron tomadas con una cámara Coolpix 995 Nikon digital sobre microscopio óptico (aumento total de 40 y 100X) y se procesaron con el software Adobe Photoshop versión 11.0.

4.1.2.3.2.2 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-1

Un análisis similar fue llevado a cabo con las plantas que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-1. En este caso, la expresión del gen reportero fue claramente detectada en las regiones meristemáticas del vástago y raíz de las plántulas analizadas, como así también en las venas y lámina de los cotiledones y en la raíz (figura 12 A-C).

En plantas adultas, la expresión se hizo evidente en las venas y lámina de la hoja (figura 12 D), en la raíz (figura 12 J), en granos de polen, en el estigma y receptáculo de la flor (figura 12 F y G), y en similares estructuras de la vaina (figura 12 H e I).

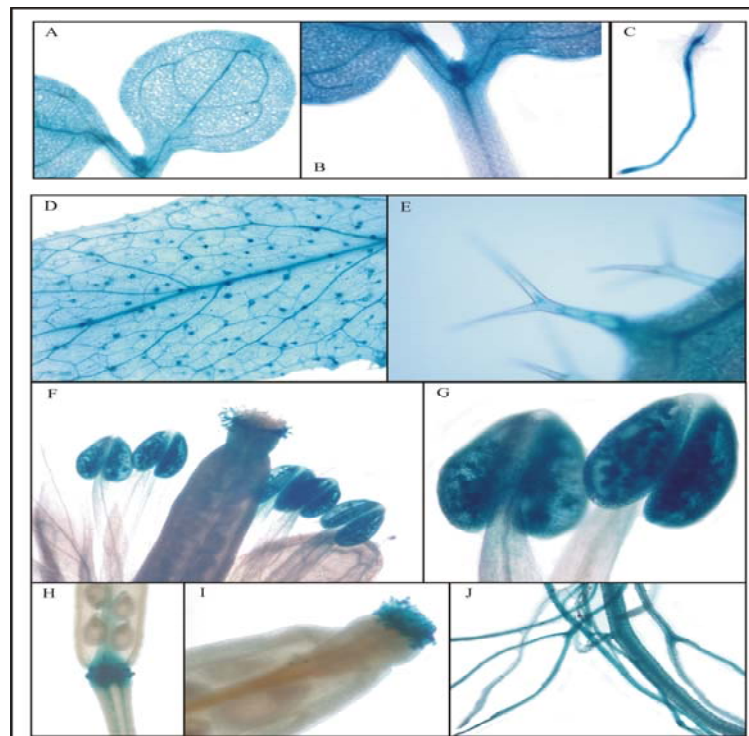


Figura 12: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-1. En plántulas de 7 días, A) detalle de los cotiledones; B) meristema apical del vástago; C) raíz. En plantas adultas, D) detalle de la hoja; E) tricomas; F) anteras y estigma de la flor; G) detalle de anteras; H) receptáculo de la vaina; I) estigma de la vaina; J) detalle de la raíz.

4.1.2.3.2.3 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-2

El análisis de la expresión del gen reportero *gus* en las plantas transgénicas que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-2 arrojó un resultado similar al obtenido con la construcción pBI-AtCOX6b-1. En plántulas de hasta 15 días de desarrollo la tinción resultó evidente en el meristema apical del vástago, en las venas y lámina de los cotiledones y en las venas de la primera línea de hojas (figura 13 A). Asimismo, se detectó la presencia del transgén con fuerte intensidad en la raíz (figura 13 C), pero no en el hipocotilo (figura 13 B). En plantas adultas, la expresión del gen reportero fue identificada en las venas de la hoja (figura 13 G), en la raíz (figura 13 H), como así también en granos de polen, venas de los sépalos, receptáculo y estigma de la flor (figura 13 D-F) y de la vaina (figura 13 I).

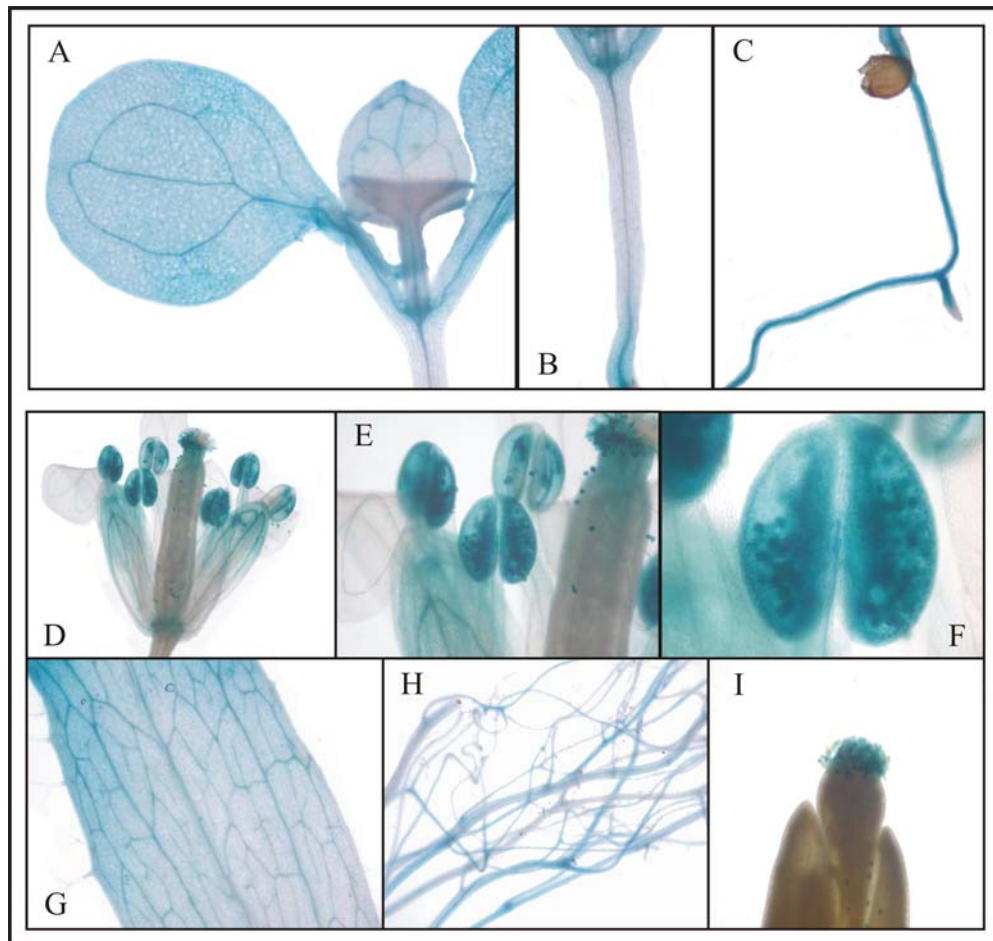


Figura 13: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-2. En plántulas de 15 días, A) detalle de los cotiledones, primera línea de hojas y meristema apical del vástago; B) hypocotilo; C) raíz. En plantas adultas, D), E) y F) flor y detalles de anteras y estigma de la flor; G) detalle de la hoja; H) detalle de la raíz; I) estigma de la vaina.

4.1.2.3.2.4 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-3

En los estadios tempranos del desarrollo de las plantas que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-3, la presencia de actividad enzimática GUS se detectó con gran intensidad en las venas y lámina de los cotiledones (figura 14 A), en el meristema apical y haz vascular de la raíz (figura 14 B), como así también en el meristema apical del vástago y en las venas, lámina y tricomas de la primera línea de hojas (figura 14 C).

En plantas adultas, la tinción se hizo evidente en todos los órganos analizados. En hojas, la expresión del gen *gus* fue detectada en las venas, lámina y tricomas (figura 14 D), conservando el patrón observado en plántulas (figura 14 C). En raíces, se observó una fuerte tinción (figura 14 F), en concordancia con lo observado en este órgano de la planta en los primeros estadios del desarrollo (figura 14 B). Finalmente, en flores, la expresión del gen reportero se detectó en granos de polen y en el estigma (figura 14 G y H), conservándose este patrón con la maduración de la vaina (figura 14 I).

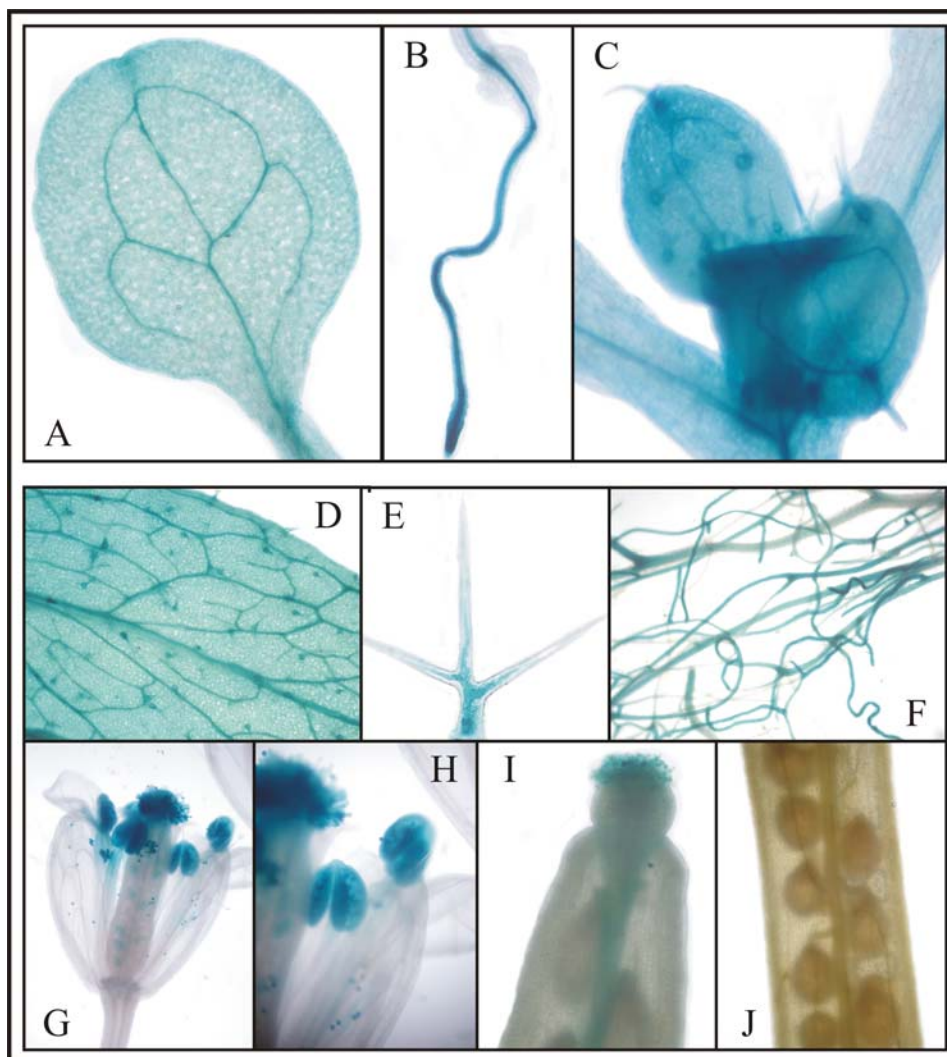


Figura 14: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-3. En plántulas de 10 días, A) cotiledón; B) raíz y C) detalle del meristema apical del vástago y primera línea de hojas. En plantas adultas, D) detalle de la hoja; E) tricoma de la hoja; F) raíz; G) flor; H) detalle de anteras y estigma; I) detalle del estigma de la vaina; J) detalle de la vaina.

4.1.2.3.2.5 Acortamientos sucesivos de las regiones promotoras de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3*

Una vez determinado el patrón de expresión de los genes en estudio, se procedió a realizar deleciones sucesivas de cada una de sus regiones promotoras con el fin de determinar cual era la mínima secuencia requerida en cada caso para que la expresión génica se lleve a cabo.

De esta manera, siguiendo la metodología descrita en los puntos 2.2.1.1.1 a 2.2.1.1.4 de Materiales y Métodos, se obtuvieron los siguientes fragmentos de ADN:

- 742 pb, 636 pb, 508pb, 357 pb y 162 pb del promotor del gen *AtCOX6a*;
- 689 pb, 458 pb y 238 pb del promotor del gen *AtCOX6b-1*
- 196 pb del promotor del promotor del gen *AtCOX6b-2*
- 867 pb, 499 pb y 199 pb del promotor del gen *AtCOX6b-3*

En todos los acortamientos analizados el patrón de expresión histoquímico fue idéntico al observado con las construcciones que contenían las secuencias promotoras completas (resultados no mostrados).

4.1.2.3.2.6 Mutagénesis sitio dirigida de los elementos *site II* en las regiones promotoras analizadas

De la observación minuciosa de las secuencias de los promotores mínimos, se destaca la presencia de un elemento regulador transcripcional conocido como *site II*. Este motivo posee la secuencia 5'-TGGGCC/T-3' y ha sido identificado en varios genes de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial (Welchen y González, 2005;

Welchen y González, 2006; Comelli y Gonzalez, 2009). Por tal motivo, se realizaron mutaciones puntuales de las copias que dicho elemento presenta en las regiones promotoras completas. Siguiendo la estrategia descrita en el apartado 2.2.1.1.1, se introdujo la modificación del dinucleótido GG por TT en las posiciones 3 y 4 del motivo *site II*. De esta manera, se obtuvieron las construcciones pBI-COX6a(mutS2), pBI-COX6b-1(mutS2), pBI-COX6b-2(mutS2) y pBI-COX6b-3(mutS2). Una vez obtenidas las plantas que contenían estas construcciones, se realizó un análisis histoquímico de la expresión del gen reportero *gus*.

4.1.2.3.2.6.1 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcciones pBI-COX6a(mutS2), pBI-COX6b-1(mutS2), pBI-COX6b-2(mutS2) y pBI-COX6b-3(mutS2)

Las plantas transformadas con la construcción pBI-COX6a(mutS2) presentaron el mismo patrón de expresión *gus* que las plantas que contenían la misma construcción, pero con los elementos *site II* intactos (resultados no mostrados).

Sin embargo, el mismo análisis llevado a cabo con las plantas transgénicas que contenían la construcción pBI-COX6b-1(mutS2) mostró un patrón de tinción muy diferente al observado con aquellas plantas transformadas con la construcción pBI-COX6b-1. En la figura 15, se resume el patrón histológico obtenido al mutar los elementos *site II* en el promotor del gen *AtCOX6b-1*. Como puede observarse, en plántulas de 10 días, la tinción se redujo notablemente y sólo se detectó con baja intensidad en el meristema apical del vástago (figura 15A-C).

En plantas adultas, la actividad enzimática GUS sólo se observó en granos de polen (figura 15D) y en el estigma de la flor. En la vaina, la tinción se puso de manifiesto en los pelos del estigma (figura 15F) y en el receptáculo (figura 15E), de igual manera a lo observado previamente con el promotor sin mutar.

Esta disminución drástica de la expresión también se observó en las plantas que contenían las construcciones pBI-COX6b-2(mutS2) y pBI-COX6b-3(mutS2). En el primer caso, se detectó tinción en el meristema apical del vástago (figura 16A) y ápice

del cotiledón (figura 16B) en las plántulas de hasta 20 días de desarrollo. En plantas adultas, la expresión sólo fue detectada en granos de polen (figura 16E), receptáculo y pelos del estigma de la flor (figura 16D) y de la vaina (figura 16H e I), como así también, aunque débilmente, en las venas de la hoja (figura 16F). En el segundo caso, es decir, en aquellas plantas transformadas con la construcción pBI-COX6b-3(mutS2), se observó un patrón de tinción similar al descrito para pBI-COX6b-2(mutS2), con la única diferencia que en este caso no se observó expresión en el ápice de los cotiledones (figura 17).

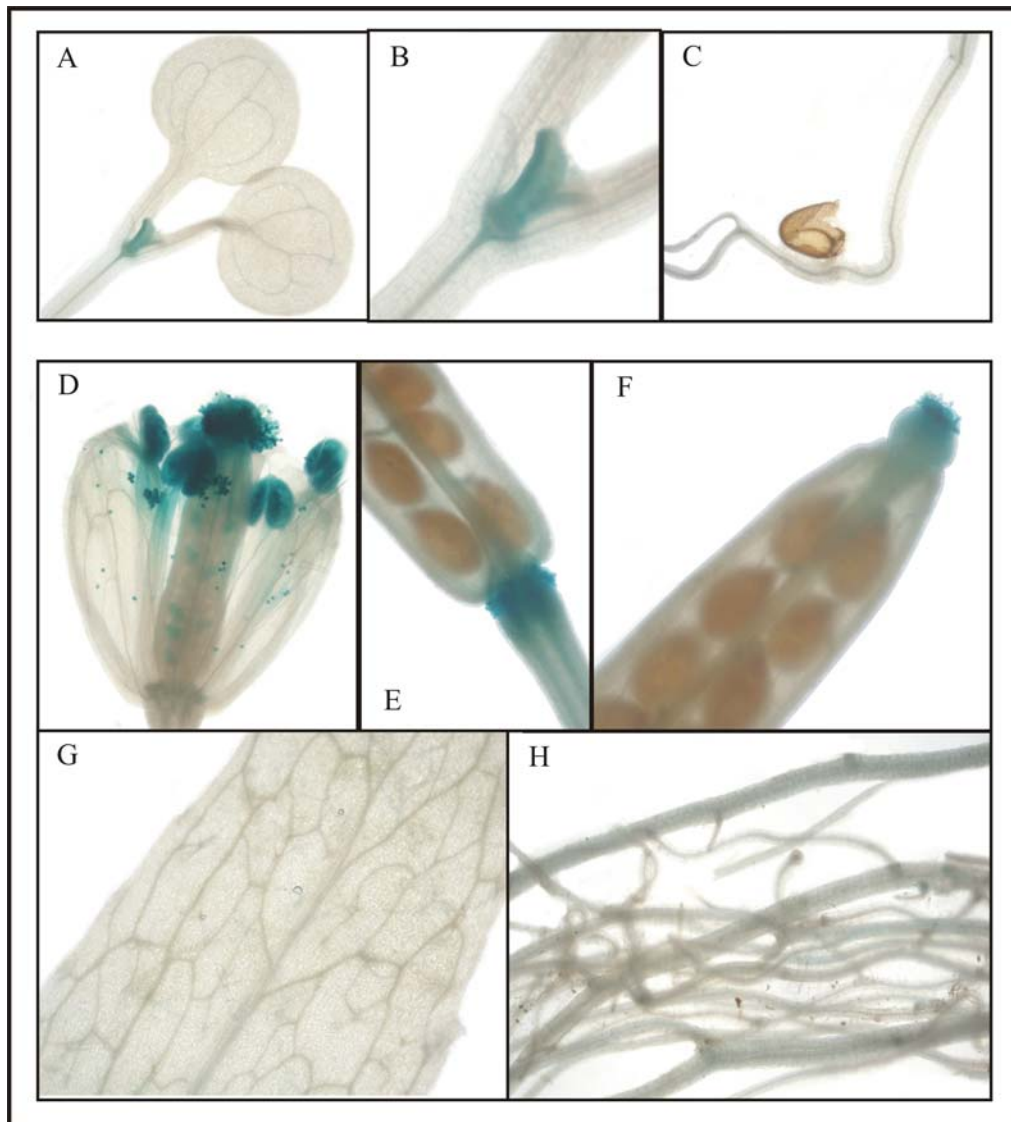


Figura 15: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-1(mutS2). En plántulas de 7 días, A) cotiledones; B) detalle del meristema apical del vástago; C) raíz. En plantas adultas, D) flor; E) detalle del receptáculo de la vaina; F) detalle del estigma de la vaina; G) detalle de la hoja; H) raíz.

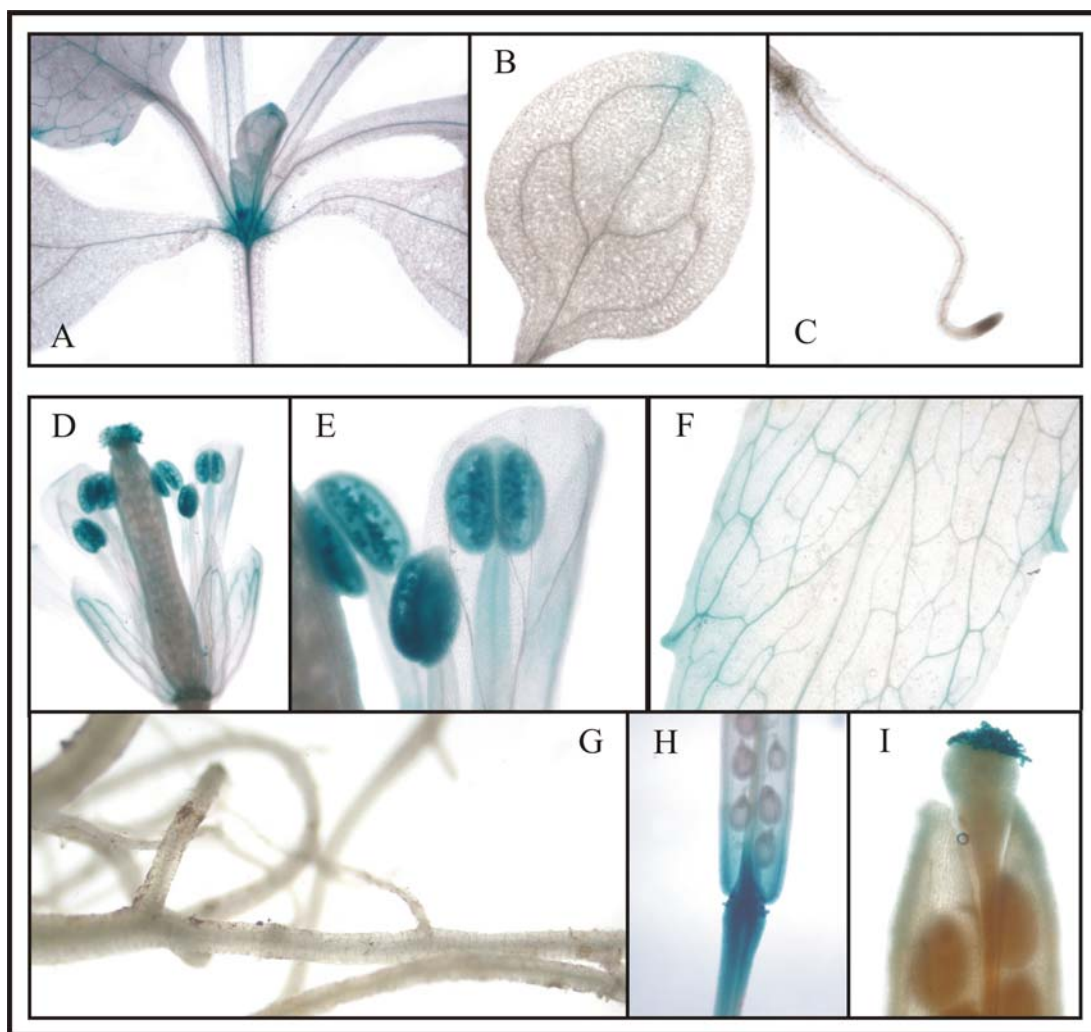


Figura 16: Detección histoquímica de actividad GUS en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-2(mutS2). En plántulas de 20 días, A) detalle del meristema apical del vástago; B) detalle del cotiledón; C) detalle de la raíz. En plantas adultas, D) flor; E) detalle de anteras; F) detalle de la hoja; G) raíz; H) e I) detalle del receptáculo y estigma de la vaina, respectivamente.

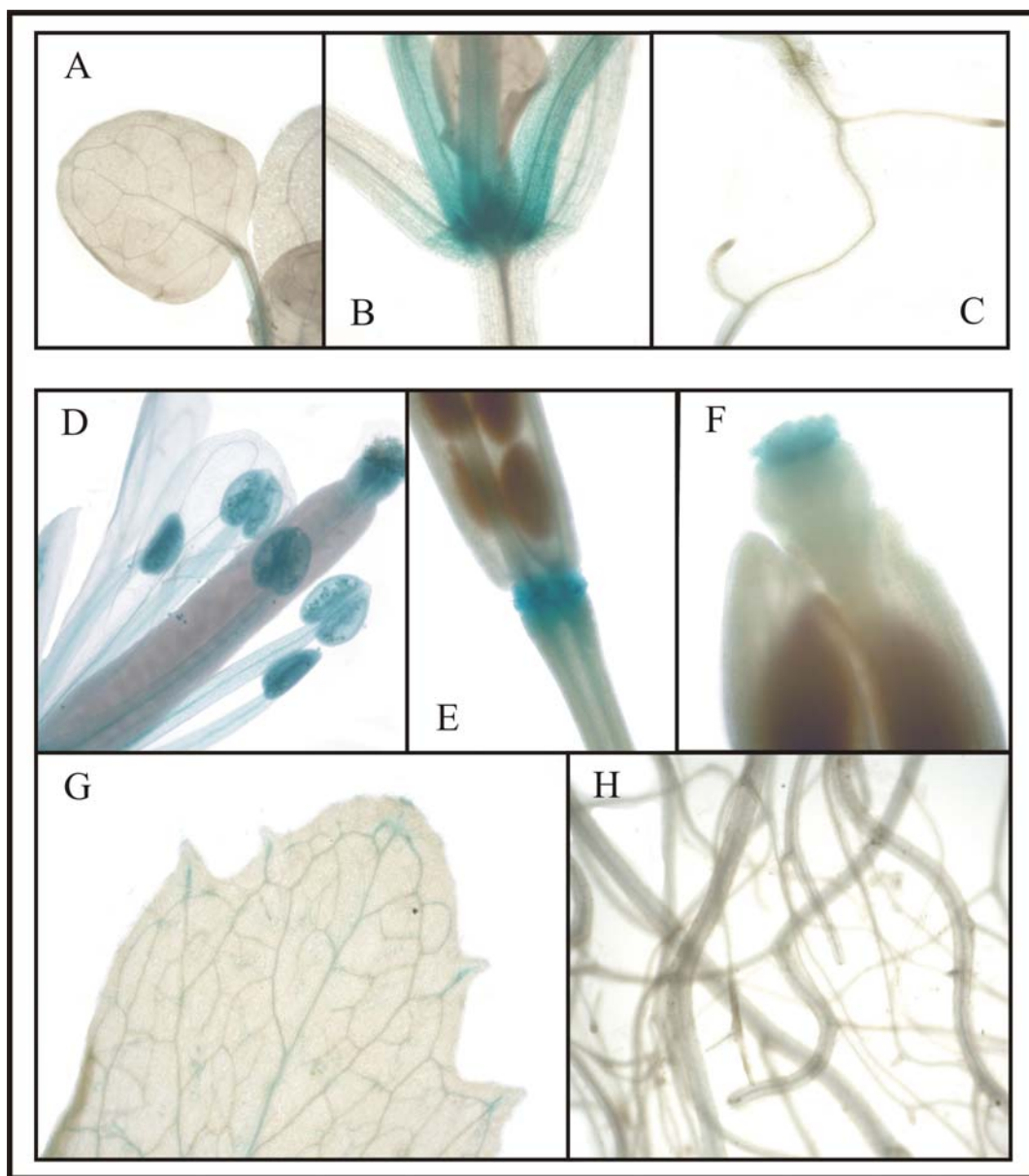


Figura 17: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-3(mutS2). En plántulas de 20 días, A) detalle de cotiledón y primera línea de hojas; B) detalle del meristema apical del vástago; C) detalle de la raíz. En plantas adultas, D) flor; E) y F) detalle del receptáculo y estigma de la vaina; G) hoja y H) raíz.

Dado que las versiones acortadas de las regiones promotoras de interés presentaban un patrón de expresión similar al de las regiones completas utilizadas, se

planteó el interrogante acerca de la posible existencia de otros elementos capaces de regular la expresión de estos genes, además de los motivos *site II*, en la región proximal del promotor. Por tal motivo, decidimos realizar tres deleciones adicionales en el promotor del gen *AtCOX6b-1* siguiendo la estrategia del punto 2.2.1.1.2 de Materiales y Métodos. Estas deleciones se realizaron sobre la secuencia de 180 pb comprendida entre el último elemento *site II* (el más cercano al sitio de inicio de la traducción) y el codón de iniciación, e involucraron la supresión de 60 pb cada una. El patrón de expresión de las plantas transformadas con estas construcciones fue idéntico al observado con las plantas que contenían la construcción pBI-*AtCOX6b-1* (resultados no mostrados). Esto sugeriría que no existen elementos transcripcionales corriente abajo de los motivos *site II*, o bien que, de existir, los mismos son redundantes.

4.1.2.3.3 Análisis fluorométrico de actividad GUS en extractos de plantas transgénicas

4.1.2.3.3.1 Análisis fluorométrico de actividad GUS en plántulas

Con el fin de obtener una medida cuantitativa de la actividad GUS en las plantas transformadas con las distintas construcciones, se realizaron ensayos fluorométricos de actividad β -glucuronidasa, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.9.4.2 de Materiales y Métodos. Se utilizaron extractos proteicos obtenidos a partir de tres líneas independientes de cada construcción génica. Las lecturas fluorométricas de cada muestra se realizaron por triplicado de manera de poder realizar un análisis estadístico con los resultados obtenidos. Con estos valores se calculó la media (representada por la altura de las barras) y el desvío estándar (barras de error) en cada caso.

Para este análisis se utilizaron plántulas transformadas con las construcciones descritas. Asimismo, se analizaron, como controles, plántulas no transformadas (wt) y plántulas transformadas con el vector pBI101.3 (controles negativos), y plántulas transformadas con el vector pBI121 (control positivo) (figura 18).

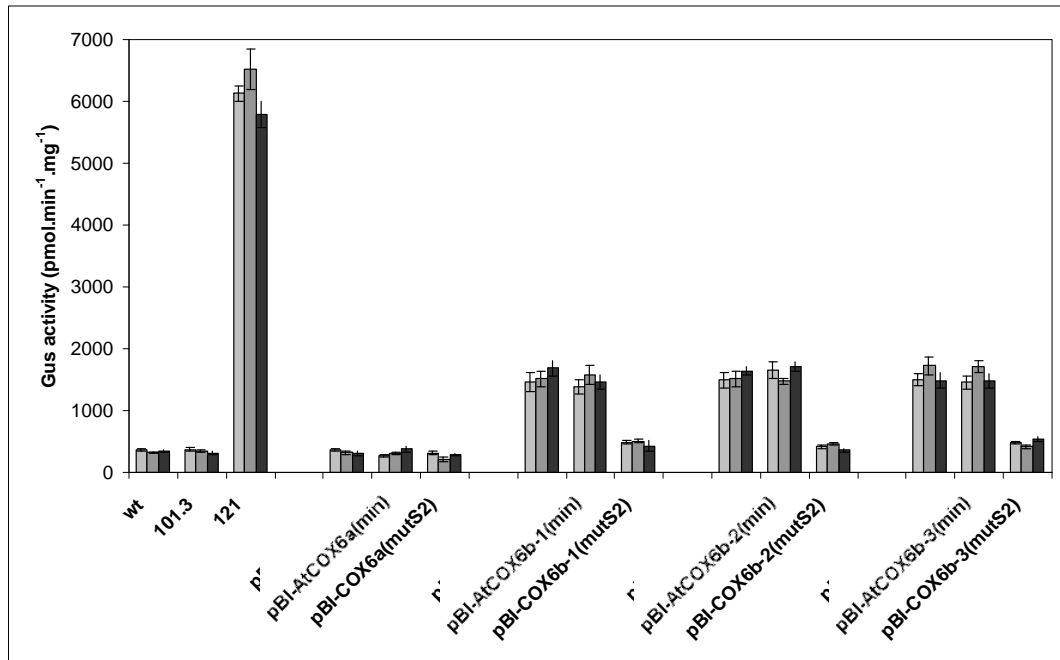


Figura 18: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas transgénicas de 15 días. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Los vectores indicados fueron los empleados para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*. pBI101.3 y pBI121 se refieren a la actividad enzimática en plantas transformadas con estos vectores y wt hace referencia a la actividad GUS medida en plántulas no transformadas. Se realizaron tres ensayos para cada una de las tres líneas independientes analizadas por cada construcción.

Como puede observarse, los niveles de actividad enzimática GUS en las plántulas que contienen las construcciones pBI-AtCOX6b-1, pBI-AtCOX6b-2 y pBI-AtCOX6b-3 son muy similares y significativamente superiores con respecto a los controles negativos. Esto refuerza el resultado obtenido mediante el análisis histoquímico, en el cual los patrones de expresión observados en estas plántulas eran prácticamente idénticos. Asimismo, en el caso de las plántulas que contienen la construcción pBI-AtCOX6a, los niveles de actividad enzimática obtenidos son semejantes a los de los controles negativos, resultado que se corresponde también con el histoquímico. Cabe mencionar que las plántulas que contienen los promotores mínimos alcanzaron niveles similares a los de los promotores completos. La notoria disminución

en la expresión del gen *gus* observada mediante el análisis histoquímico en aquellas plántulas que contenían las construcciones pBI-AtCOX6b-1(mutS2), pBI-AtCOX6b-2(mutS2) y pBI-AtCOX6b-3(mutS2) también se puso en evidencia en el análisis fluorométrico, ya que en estos casos los niveles de actividad registrados resultaron apenas superiores a los de los controles negativos.

4.1.2.3.3.2 Análisis fluorométrico de actividad GUS en distintos órganos de plantas transformadas

Para la realización de este estudio se utilizaron órganos obtenidos de plantas transgénicas adultas de 40 días que contenían las construcciones mencionadas en el apartado anterior. Se emplearon tres líneas independientes de cada construcción y las reacciones se realizaron por triplicado. De esta manera, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.9.4.2 de Materiales y Métodos, se analizaron los siguientes órganos de la planta: hoja, flor, vaina, raíz y tallo. Con los valores obtenidos se determinó la media y el desvío estándar en cada caso, que luego fueron representados gráficamente en las figuras 19, 20, 21 y 22.

Como puede observarse, en el caso de las plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6a, los niveles de actividad enzimática GUS alcanzados en todos los órganos, excepto en flores, resultaron bajos, lo que se condice con lo observado en el análisis histoquímico, donde sólo se observó tinción en granos de polen. Asimismo, los órganos de las plantas transformadas con la versión acortada de dicha región promotora y aquella en la que los motivos *site II* habían sido mutados, presentaron niveles de actividad comparables con los de los órganos de las plantas que contienen la construcción pBI-AtCOX6a (figura 19).

Con respecto a las plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-1, los niveles de actividad específica GUS registrados en hoja, vaina y flor fueron similares y superiores con respecto a raíz y tallo. Sin embargo, en raíz, a diferencia de lo que ocurre en tallo, los niveles alcanzados son suficientes como para que el gen reportero sea detectado con la tinción histoquímica. Por otra parte, los órganos de las

plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-1(mín) exhibieron niveles de actividad GUS similares a los de las plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-1, lo que pondría de manifiesto la carencia de elementos transcripcionales relevantes en la región delecionada. El efecto observado en el análisis histoquímico como consecuencia de la mutación de los elementos *site II* también se vio reflejado en el análisis fluorométrico. En este caso, la ausencia de estos motivos se manifestó fuertemente en hoja, vaina, raíz y flor, donde la actividad se redujo a un 25% en la primera y a un 50% en las restantes, aproximadamente. Cabe mencionar que en el caso de la vaina y la flor los niveles del gen reportero resultaron superiores a los de la hoja y la raíz. Esto se condice con el resultado histoquímico, ya que en las primeras los niveles de tinción fueron fácilmente observables, mientras que en las segundas no se detectó tinción alguna.

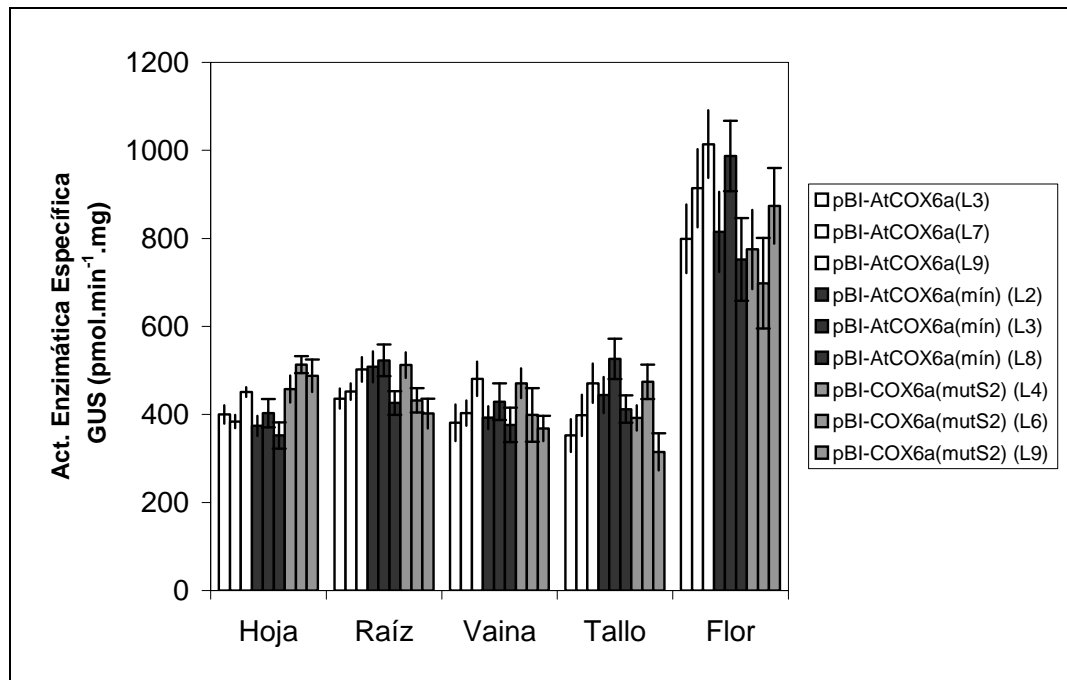


Figura 19: Niveles de actividad β -glucuronidasa en órganos de plantas transgénicas que contienen las construcciones indicadas a la derecha de la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron cinco órganos de cada una de las tres líneas de cada construcción, realizando las determinaciones por triplicado.

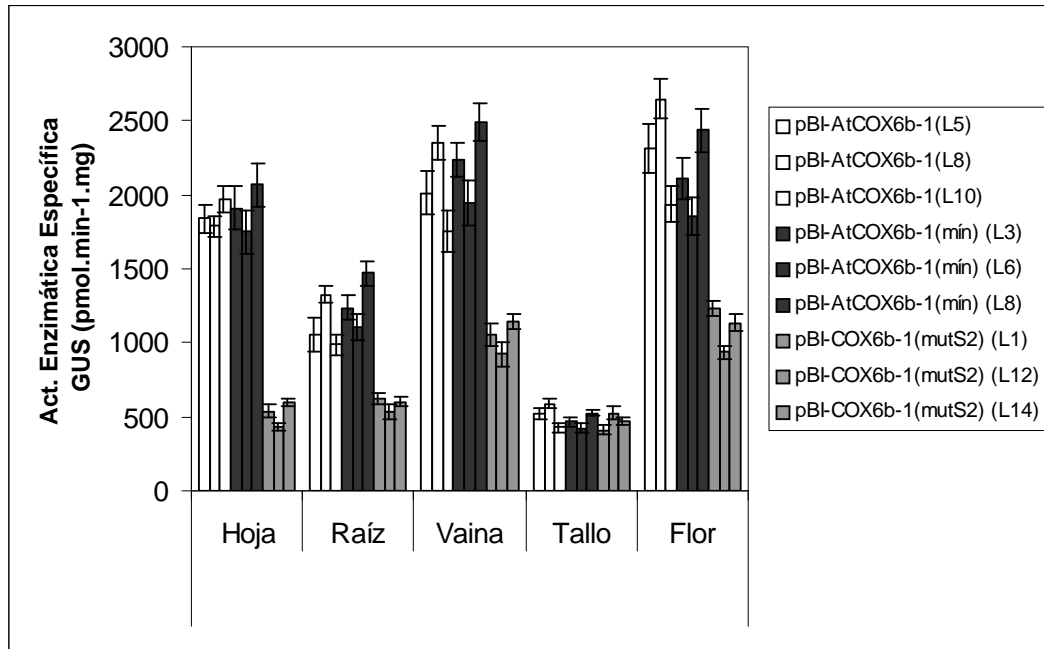


Figura 20: Niveles de actividad β -glucuronidasa en órganos de plantas transgénicas que contienen las construcciones indicadas a la derecha de la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron cinco órganos de cada una de las tres líneas de cada construcción realizando las determinaciones por triplicado.

Una situación similar se pudo observar con el análisis fluorométrico realizado a partir de los órganos de las plantas transformadas con las construcciones de los promotores de los genes *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3* (figuras 21 y 22, respectivamente). Estos resultados también están en concordancia con los obtenidos mediante el análisis histoquímico. Resulta conveniente destacar que los niveles de actividad enzimática GUS resultaron muy similares en todos los órganos analizados para plantas transformadas con las construcciones pBI-AtCOX6b-1, pBI-AtCOX6b-2 y pBI-AtCOX6b-3 y en los respectivos acortamientos.

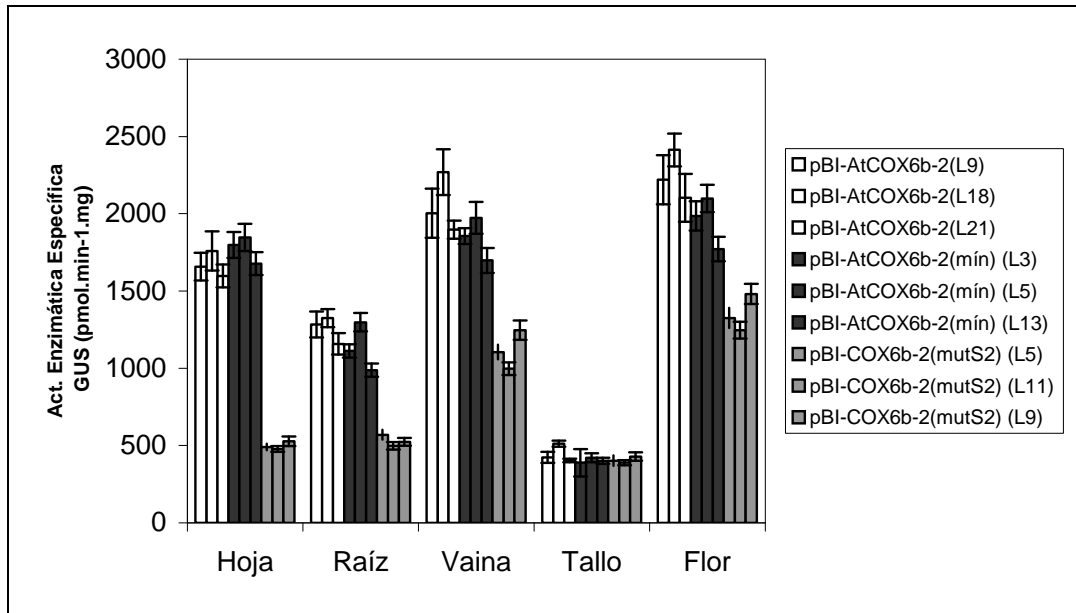


Figura 21: Niveles de actividad GUS en órganos de plantas transgénicas que contienen las construcciones indicadas a la derecha de la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron cinco órganos de cada una de las tres líneas de cada construcción realizando las determinaciones por triplicado.

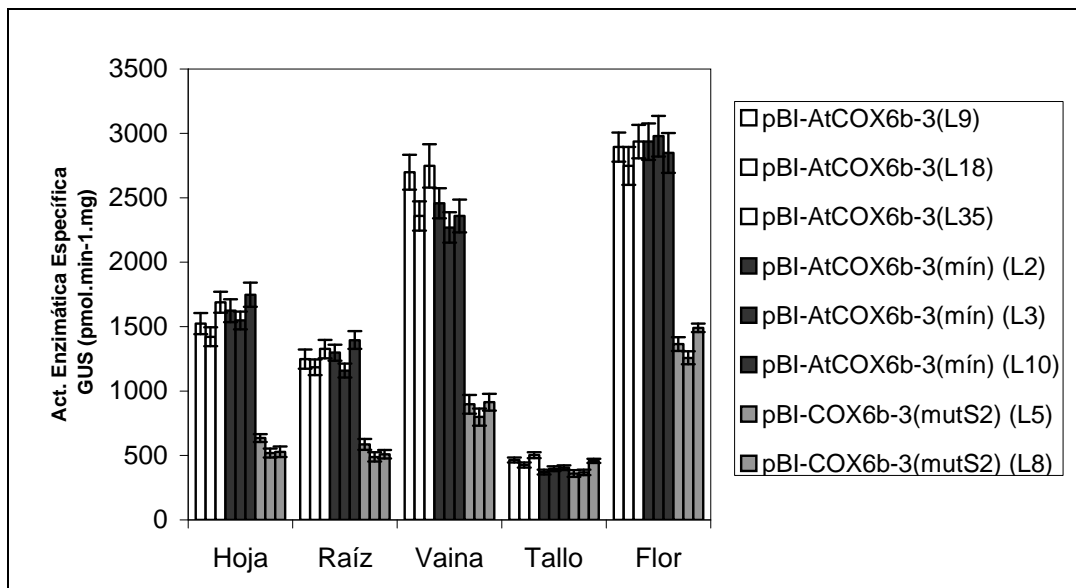


Figura 22: Niveles de actividad GUS en órganos de plantas transgénicas que contienen las construcciones indicadas a la derecha de la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se

analizaron cinco órganos de cada una de las tres líneas de cada construcción realizando las determinaciones por triplicado.

4.1.2.4 Análisis de la interacción *in vitro* entre los fragmentos de las regiones promotoras de los genes *AtCOX6* y proteínas de un extracto nuclear de inflorescencias - Ensayos de movilidad electroforética en geles de retardo (Band shift):

De acuerdo a los resultados obtenidos con las regiones promotoras de los genes *AtCOX6*, sólo serían necesarios unos 200 pb, aproximadamente, corriente arriba del sitio de inicio de la traducción para que los genes analizados se expresen en forma correcta, tanto espacial como temporalmente. Además, también se determinó que los motivos *site II* contenidos en estas regiones resultan importantes para la expresión de estos genes. Por tal motivo, se intentó determinar si estos fragmentos eran capaces de unir factores de transcripción presentes en un extracto de proteínas nucleares y evaluar, por otro lado, el efecto de la ausencia de los elementos *site II* en esta interacción. La coliflor es una planta perteneciente a la familia de las Brassicaceae, familia a la que también pertenece *Arabidopsis thaliana*. Considerando el enriquecimiento en proteínas que presentan las flores, la riqueza de este órgano en la planta de coliflor y la cercanía entre los géneros *Brassica* y *Arabidopsis*, se escogió al primero como fuente de proteínas nucleares para la realización del ensayo de electroforesis en geles de retardo.

Los ensayos de “Band shift” resultan de gran utilidad cuando se desea conocer si una o más proteínas puras, o como componentes de un extracto, son capaces de interaccionar *in vitro* con una dada secuencia de ADN. Esta interacción puede evaluarse mediante la diferencia en la migración del complejo ADN/proteína con respecto al ADN no unido.

Siguiendo la metodología descrita en los apartados 2.2.7.9 y 2.2.7.10 de Materiales y Métodos, se realizó la marcación radioactiva y purificación de los fragmentos de cada uno de los promotores analizados:

- Fragmento del promotor de *AtCOX6a*, comprendido entre los nucleótidos -193 a -1 con respecto al codón ATG.
- Fragmento del promotor de *AtCOX6b-1*, comprendido entre los nucleótidos -238 a -101 con respecto al codón ATG.
- Fragmento del promotor de *AtCOX6b-2*, comprendido entre los nucleótidos -196 a -1 con respecto al codón ATG.
- Fragmento del promotor de *AtCOX6b-3*, comprendido entre los nucleótidos -199 a -2 con respecto al codón ATG.

Luego, mediante la estrategia detallada en el apartado 2.2.8.7.1, se realizó el ensayo de movilidad electroforética en geles de retardo obteniéndose los resultados ilustrados en la figura 23.

Como puede observarse en la figura 23 (A), existe una clara unión entre el fragmento del promotor del gen *AtCOX6b-1* y proteínas del extracto nuclear de coliflor (calle 2). Esta interacción se ve incrementada levemente al duplicar la cantidad de extracto proteico agregada al ensayo de reacción (calle 3). Además, al realizar un ensayo de competencia de este fragmento consigo mismo (sin marcar radiactivamente) en un exceso molar de unas 50 veces con respecto al fragmento marcado (denotado en la figura con “x”), puede observarse que desaparece la unión previamente detectada (calle 4). Esto reflejaría una interacción específica entre el fragmento de ADN ensayado y las proteínas del extracto. Este mismo análisis, llevado a cabo con la misma versión del fragmento, pero que carece de los motivos *site II* (calles 5, 6, 7 y 8), reveló una ausencia de “bandas de retardo”, lo que sugeriría que la señal observada en la calle 2 correspondería a proteína/s unida/s al fragmento de ADN que sí los contiene. Para reforzar esta idea, se realizaron ensayos donde se empleó como competidor el fragmento (sin marcar) que no contiene los elementos *site II*, en dos concentraciones distintas (calles 9 y 10). La clara persistencia de la “banda de retardo”, incluso cuando la cantidad de competidor excede unas 200 veces a la del fragmento marcado, puso en evidencia la especificidad de la unión entre las proteínas del extracto y estos sitios del fragmento analizado.

Un estudio similar se realizó con los fragmentos de los promotores de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3* (figura 23 B). De igual manera a lo ocurrido con *AtCOX6b-1*, al incubar los fragmentos de los 3 genes que contienen los *site II* con el extracto de proteínas nucleares (calles 4, 8 y 12, respectivamente), se pudo detectar una señal que estuvo ausente cuando los fragmentos de ADN no contenían motivos *site II* (calles 2, 6 y 10, respectivamente). Este resultado evidencia la capacidad de estos motivos de unir factores de transcripción presentes en el extracto nuclear.

Un tercer ensayo consistió en realizar “competencias cruzadas” entre los fragmentos de los promotores de los genes *AtCOX6b* (figura 23 C). En las calles 1, 2, 3 y 4 se muestran los ensayos de unión y competencia realizados con el fragmento de *AtCOX6b-1*. En las calles 5 y 6, se compitió el fragmento de ADN mencionado con los fragmentos de los promotores de *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3* en un exceso molar de 100 veces. La disminución en la señal observada (con respecto a la calle 4) sugiere que los fragmentos de los distintos promotores unen la/s misma/s proteína/s del extracto proteico.

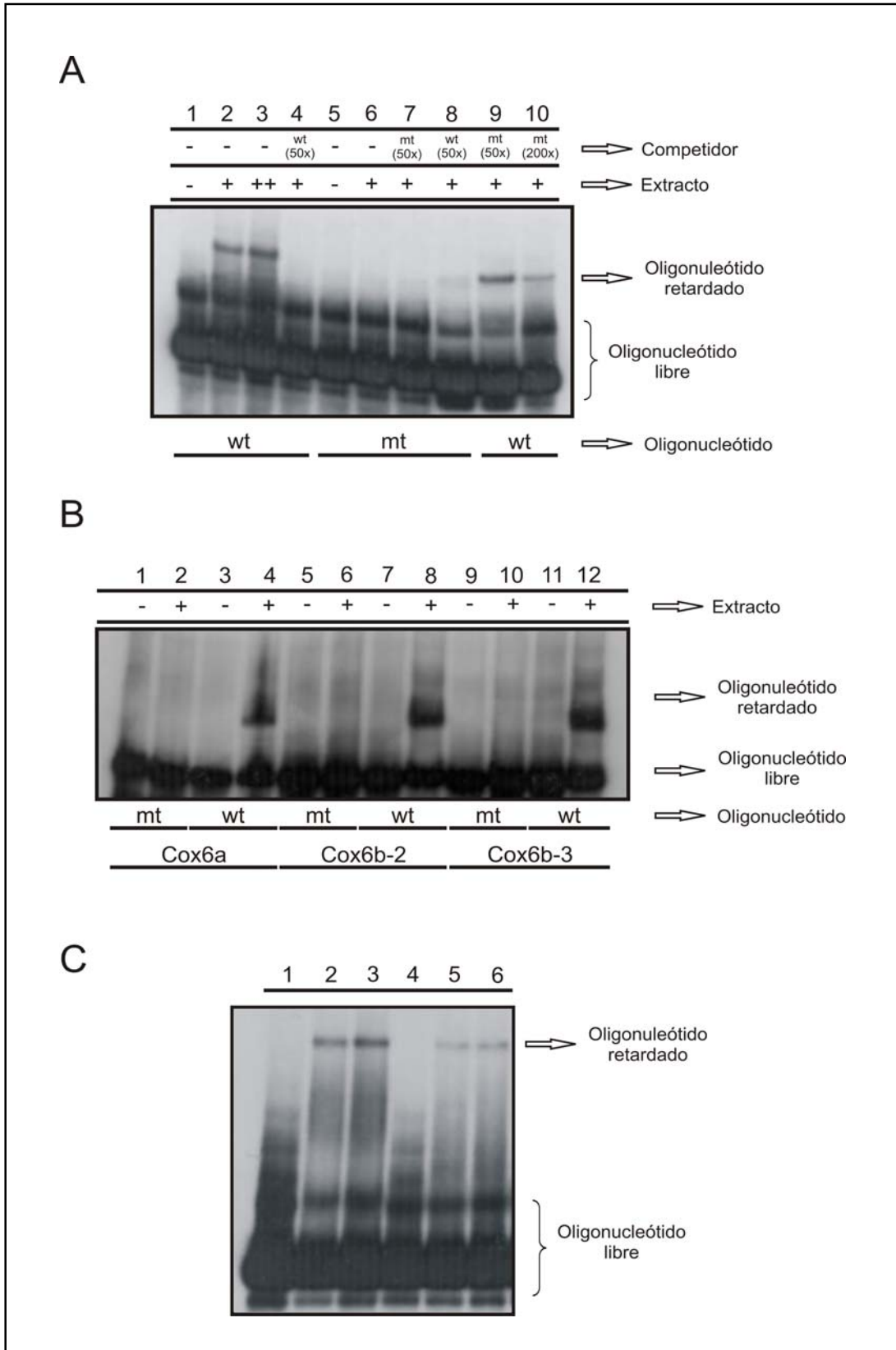


Figura 23: Ensayos retardo en geles (Band shift) con los fragmentos de promotores de los genes *AtCOX6* y extractos de proteínas nucleares de inflorescencias de coliflor. **(A) Ensayo de Band shift con fragmentos de *AtCOX6b-1*.** Calle 1: fragmento libre (con los motivos *site II*); Calle 2: incubado con 2 µg de extracto nuclear; Calle 3: incubado con 4 µg de extracto nuclear; Calle 4: ensayo de competencia con un fragmento similar no marcado y carente de elementos *site II*. Calle 5: fragmento libre (sin los motivos *site II*); Calle 6: incubado con 2 µg de extracto nuclear; Calle 7: ensayo de competencia con el mismo fragmento sin marcar; Calle 8: ensayo de competencia con el fragmento que contiene los elementos *site II*; Calles 9 y 10: ensayo de competencia con el mismo fragmento, en un exceso molar de 50 y 200 veces, respectivamente. **(B) Ensayo de Band shift realizado con los fragmentos de las regiones promotoras de los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3*.** Calle 1: Fragmento libre de *AtCOX6a* (sin los motivos *site II*); Calle 2: incubado con 2 µg de extracto nuclear; Calle 3: fragmento que contiene los motivos *site II* marcado radioactivamente; Calle 4: incubado con 2 µg de extracto nuclear; Calles 5 a 12: idéntico análisis con los fragmentos de promotores de los genes *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3*, respectivamente. **(C) Ensayos de “competencia cruzada” entre los fragmentos de los genes *AtCOX6b*.** Calles 1, 2 y 3: idénticas a (A); Calle 4: ensayo de competencia del fragmento de *AtCOX6b-1* con *site II* con el mismo fragmento no marcado, en un exceso molar de 200 veces; Calles 5 y 6: ensayo de competencia del fragmento de *AtCOX6b-1* con fragmentos de *AtCOX6b-2* o *-3*, en un exceso molar de 200 veces.

4.1.2.5 Efecto de distintos agentes físicos y químicos sobre la actividad de las regiones promotoras de *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3*

Es sabido que las plantas son capaces de adaptarse a diversas condiciones ambientales mediante cambios en el patrón de expresión espacio-temporal de genes que intervienen en determinadas rutas metabólicas, permitiéndoles sobrellevar las nuevas condiciones a las que son expuestas. Teniendo en cuenta que los genes en estudio codifican subunidades que forman parte de un complejo enzimático, que a su vez interviene en el metabolismo celular, resulta de gran interés conocer si los mismos son capaces de responder ante diversos estímulos.

Por lo tanto, una vez determinado el patrón de expresión conferido por las regiones promotoras en estudio y la implicancia de los elementos *site II* en el mismo, nos interesó dilucidar si estos genes eran capaces de responder ante la presencia de ciertos agentes físicos y químicos. El hecho de contar con las fusiones de las regiones promotoras al gen reportero *gus* significó una ventaja desde el punto de vista operativo, ya que la presencia de elementos de respuesta funcionales a los agentes empleados en

este ensayo se evidenciarían a través de un cambio en la actividad enzimática GUS con respecto a las condiciones basales.

De esta manera, siguiendo la metodología propuesta en el apartado 2.2.9.5 de Materiales y Métodos, se procedió a tratar las plántulas transformadas con las distintas construcciones analizadas. Luego del tratamiento correspondiente, se extrajeron proteínas y se realizaron los ensayos de actividad GUS por triplicado de acuerdo al punto 2.2.9.4.2. Los resultados obtenidos en cada caso se representan gráficamente en las figuras 24, 25, 26 y 27. Cabe aclarar que en el caso de los ensayos con azúcares, estos se realizaron cultivando las plántulas en medio MS-agar suplementado con sacarosa o manitol en una concentración del 3% (p/v) en total oscuridad, por lo que el control correspondiente consistió en plántulas crecidas en medio MS-agar en las mismas condiciones.

Como puede observarse en la figura 24, los niveles de actividad enzimática GUS de los extractos provenientes de plántulas que contenían la construcción pBI-AtCOX6a se vieron incrementados aproximadamente 3 veces cuando las plantas fueron sometidas a oscuridad. La inclusión de sacarosa en el medio produjo un aumento adicional de la expresión, de unas dos veces con respecto al control en oscuridad. No se observó inducción del gen reportero en aquellas plantas incubadas en presencia de manitol (azúcar no metabolizable por la planta), lo que permitiría descartar que el efecto estimulador observado en las plántulas incubadas en presencia de sacarosa se deba a un aumento en el potencial osmótico.

En el caso de las plántulas que contenían las construcciones pBI-AtCOX6b-1, pBI-AtCOX6b-2 y pBI-AtCOX6b-3, se observó un comportamiento similar al descrito anteriormente como respuesta a la incubación en condiciones de oscuridad y sacarosa (figuras 25-27). En el caso de pBI-AtCOX6b-1, también se detectó un aumento de la actividad enzimática al incubar las plántulas en presencia de giberelinas (GA_3) (figura 26). Este incremento fue de unas 3 veces, aproximadamente, con respecto al control (plantas incubadas en medio MS). Las plántulas que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-3 (figura 27) mostraron un incremento en la actividad enzimática GUS en

presencia de 6-bencilaminopurina (citoquinina). Este incremento fue de unas 2 veces con respecto a las plantas incubadas en MS (control).

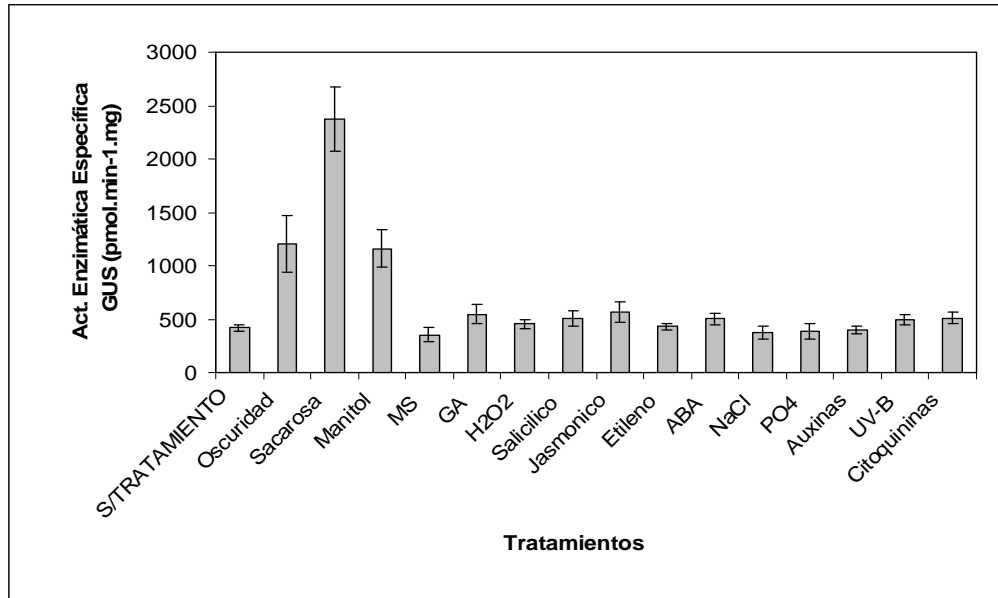


Figura 24: Niveles de actividad β-glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-AtCOX6a y tratadas con los agentes físicos y químicos detallados en la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se realizaron tres mediciones por cada tratamiento.

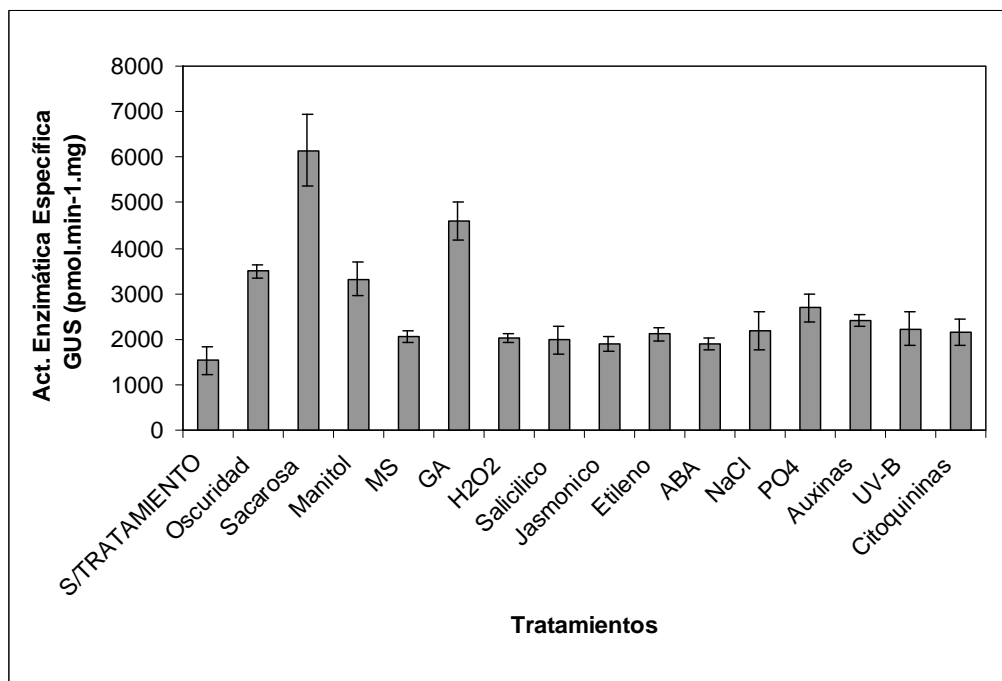


Figura 25: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-1 y tratadas con los agentes físicos y químicos detallados en la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se realizaron tres mediciones por cada tratamiento.

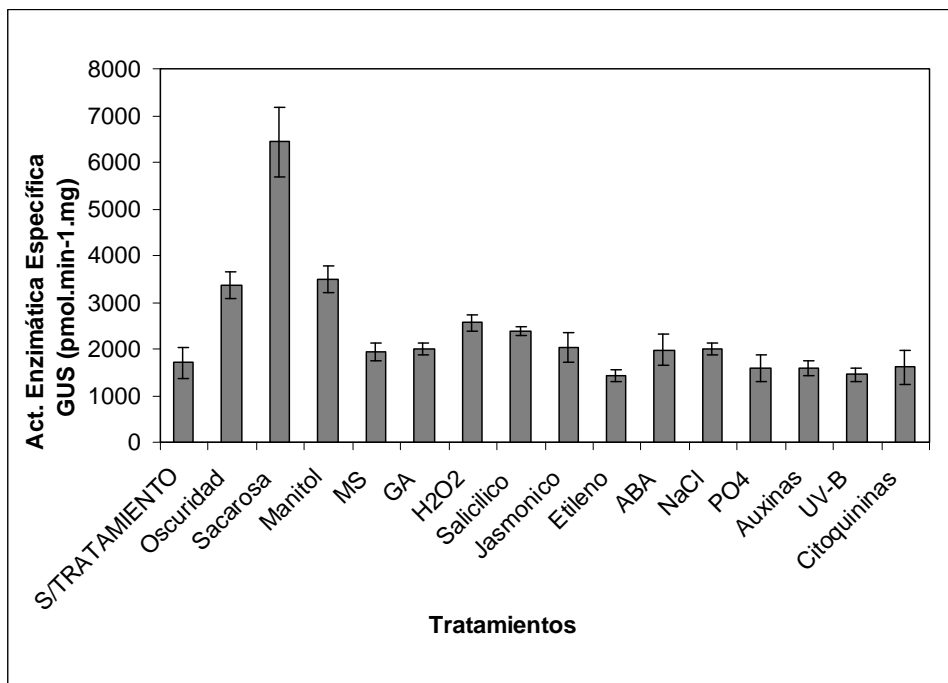


Figura 26: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-2 y tratadas con los agentes físicos y químicos detallados en la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se realizaron tres mediciones por cada tratamiento.

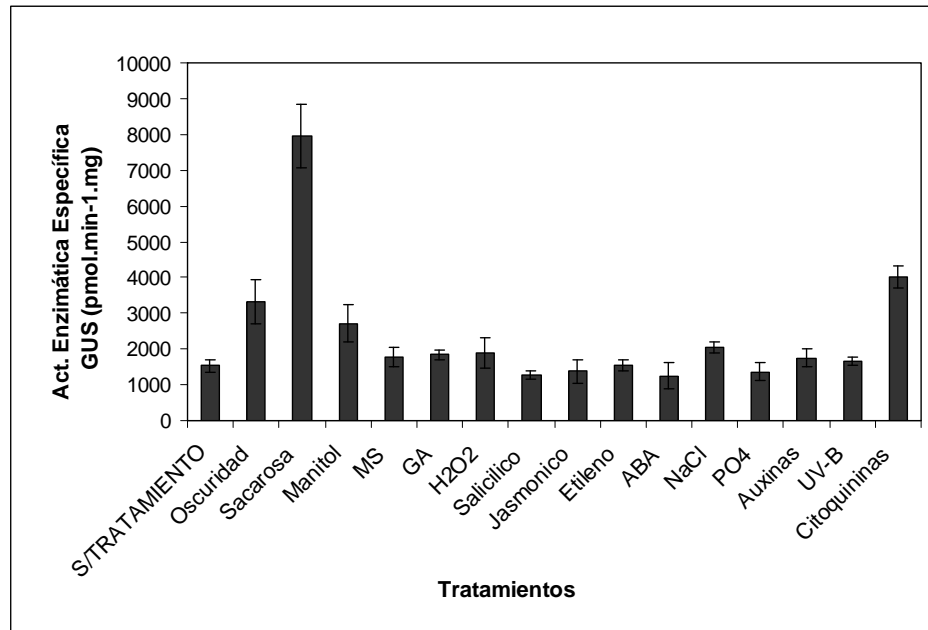


Figura 27: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-3 y tratadas con los agentes físicos y químicos detallados en la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se realizaron tres mediciones por cada tratamiento.

4.1.2.5.1 Ensayos con distintos agentes físicos y químicos en plantas transformadas con las construcciones que contienen los distintos acortamientos de las regiones promotoras en estudio

Una vez determinado el patrón de respuesta frente a diversos agentes en las plantas transformadas con las distintas fusiones al gen reportero *gus*, se intentó dilucidar la ubicación de los posibles elementos responsables de las respuestas observadas. Para lograrlo, se utilizaron en primer lugar las plantas transgénicas que contenían los promotores mínimos en cada uno de los casos.

De esta manera, mediante un análisis similar al descrito previamente, pero empleando sólo los agentes frente a los cuales se observó una respuesta notoria y 3 líneas independientes de las plantas que contienen las construcciones pBI-AtCOX6a(mín), pBI-AtCOX6b-1(mín), pBI-AtCOX6b-2(mín) y pBI-AtCOX6b-3(mín), se obtuvieron los resultados representados en las siguientes figuras.

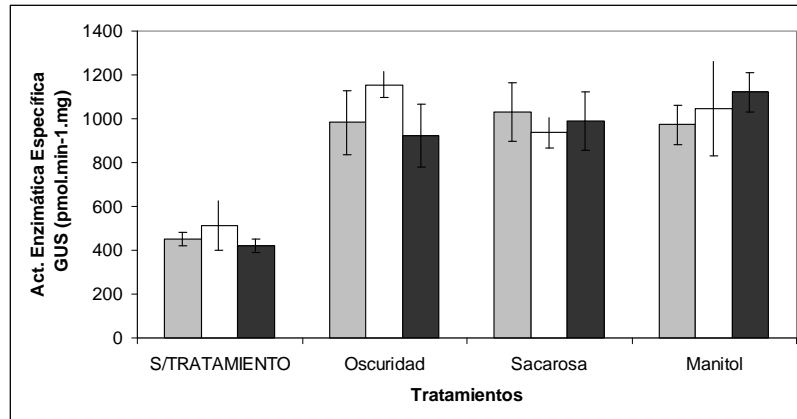


Figura 28: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-AtCOX6a(mín) y tratadas con los agentes detallados en la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron tres líneas independientes y se realizaron tres mediciones por cada tratamiento.

Como puede observarse en la figura 28, la respuesta frente a sacarosa observada con la región promotora del gen *AtCOX6a* desaparece al acortar el promotor a 162 pb. Sin embargo, persiste aún el efecto inductor detectado al incubar las plantas en oscuridad y con una intensidad similar a la evidenciada por la secuencia promotora completa.

El mismo estudio llevado a cabo con la región promotora mínima del gen *AtCOX6b-1* (figura 29), mostró una respuesta diferente, ya que al acortar el promotor a 238 pb, las respuestas a oscuridad y sacarosa persistieron. Sin embargo, el efecto inductor observado al incubar las plántulas que contienen la construcción pBI-AtCOX6b-1 con giberelinas desapareció al realizar el mismo ensayo con la versión acortada de dicho promotor.

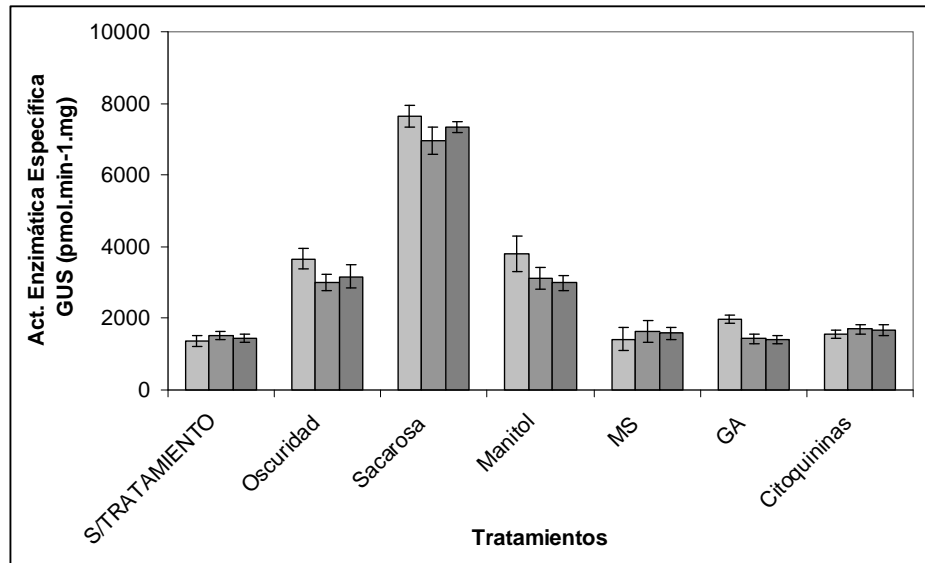


Figura 29: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-1(mín) y tratadas con los agentes detallados en la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron tres líneas independientes y se realizaron tres mediciones por cada tratamiento.

Con respecto a la región promotora del gen *AtCOX6b-2*, el efecto producido al acortarlo a 196 pb fue similar al observado en el gen *AtCOX6a*, ya que la inducción detectada al incubar las plántulas que contienen la región promotora completa con sacarosa desaparece como consecuencia de la deleción (figura 30). Sin embargo, cabe destacar que, al igual que en los casos anteriores, se mantuvo el efecto inductor al incubar estas plántulas en oscuridad.

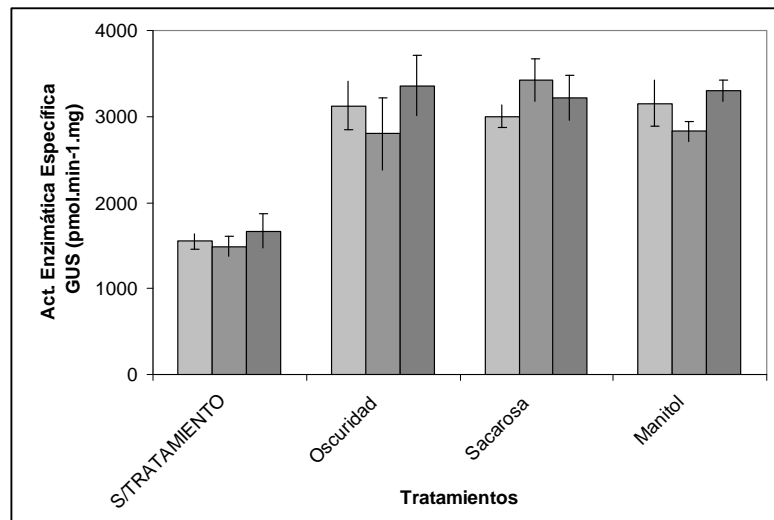


Figura 30: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-2(mín) y tratadas con los agentes detallados en la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron tres líneas independientes y se realizaron tres mediciones por cada tratamiento.

En la figura 31, se representaron gráficamente los resultados del ensayo con distintos agentes obtenidos con las plántulas que contienen la construcción pBI-AtCOX6b-3(mín). Como puede observarse, el efecto inductor al incubar las plántulas en oscuridad y sacarosa se mantuvo en una magnitud similar a la evidenciada en la versión completa de dicha región promotora. Sin embargo, la respuesta frente a citoquininas desapareció como consecuencia del acortamiento de dicha secuencia.

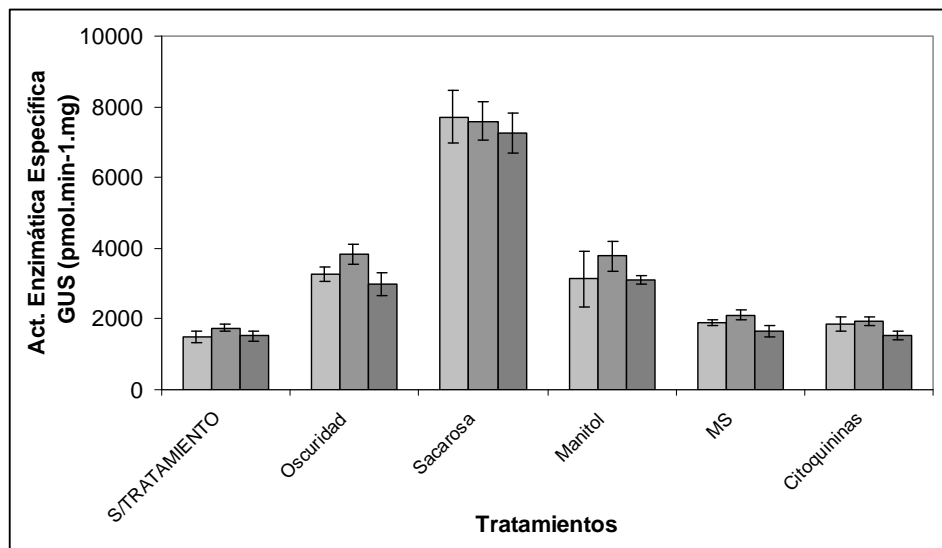


Figura 31: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-3(mín) y tratadas con los agentes detallados en la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron tres líneas independientes y se realizaron tres mediciones por cada tratamiento.

4.1.2.5.2 Búsqueda de posibles elementos comunes de respuesta a sacarosa en los promotores de los genes *AtCOX6b*

Una vez determinado el patrón de respuesta de cada región promotora mínima, llamó nuestra atención el comportamiento común que presentaron las plantas transformadas con las construcciones pBI-AtCOX6b-1(mín) y pBI-AtCOX6b-3(mín) frente a la sacarosa. Por tal motivo, realizamos una observación minuciosa de cada una de estas secuencias con el fin de determinar si existían, además de los elementos *site II*, otros “sitios” comunes entre ellas. De esta manera, identificamos un motivo similar y común en ambas, con la secuencia 5'-TACTAA-3', previamente reportado en la bibliografía como “SURE2” y ubicado en el promotor del gen *patatin* de papa. Este elemento es similar a ciertas secuencias involucradas en la respuesta a sacarosa en otros genes (Grierson y col. 1994). En la región promotora del gen *AtCOX6b-1* este sitio se encuentra ubicado en la posición -197, mientras que en el promotor de *AtCOX6b-3* se halla en la posición -170 con respecto al sitio de inicio de la traducción. Al realizar la búsqueda de tal motivo en la secuencia promotora del gen *AtCOX6b-2*, encontramos

que éste contenía dos copias del mismo en las posiciones -310 y -249 con respecto al codón ATG inicial, contenidas en dos secuencias de 19 pb idénticas (subrayadas en la figura 8). Estos elementos quedaron excluidos en la construcción pBI-AtCOX6b-2(mín) y las plantas transformadas con la misma no mostraron inducción frente a la sacarosa. Esto reforzó nuestro interés en determinar si la mutación de dicho elemento era capaz de anular la respuesta frente a este efector de las regiones promotoras completas. En este sentido, empleando la estrategia de mutagénesis sitio dirigida descrita en el apartado 2.2.1.1.1 de Materiales y Métodos, y los oligonucleótidos 6bMUTSAC detallados en el Anexo I, se realizó el reemplazo, en las tres regiones promotoras analizadas, de tres nucleótidos de la región central de este elemento. Las construcciones obtenidas de esta manera y las plantas que las contienen fueron denominadas: pBI-AtCOX6b-1(mutSAC), pBI-AtCOX6b-2(mutSAC) y pBI-AtCOX6b-3(mutSAC).

Como se puede observar en la figura 32, la mutación del elemento SURE2 en la región promotora del gen *AtCOX6b-1* condujo a una falta de respuesta frente a la sacarosa. En este caso se evaluaron tres líneas independientes que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-1 como control y siete que estaban transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-1(mutSAC).

Al realizar un análisis similar con los promotores de los genes *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3*, se obtuvieron resultados similares a los descritos para el promotor de *AtCOX6b-1* (figuras 33 y 34).

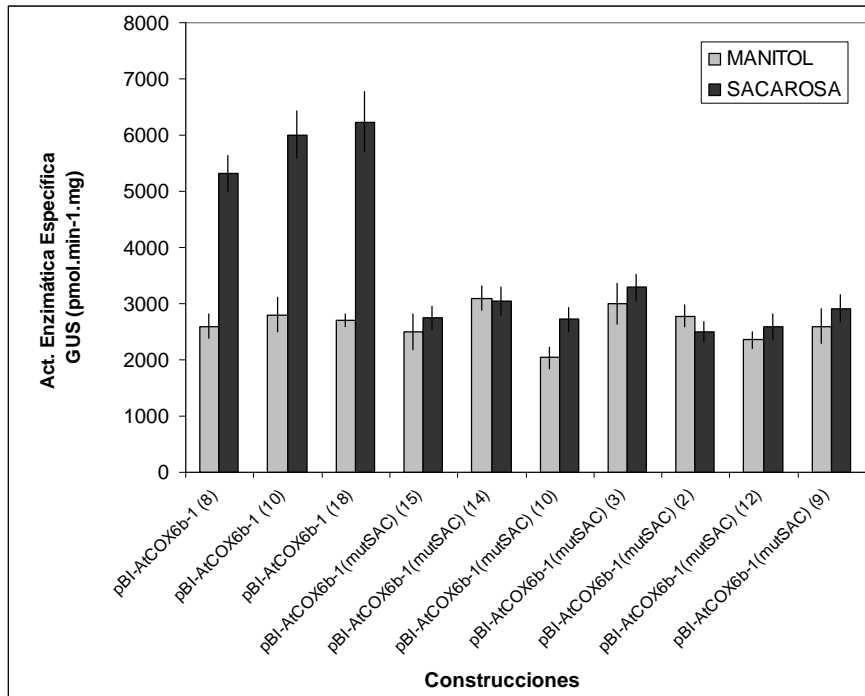


Figura 32: Niveles de actividad β-glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con las construcciones pBI-AtCOX6b-1 ó pBI-AtCOX6b-1(mutSAC), incubadas en oscuridad. Se analizaron tres líneas independientes en el primer caso y siete en el segundo. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ y se realizaron tres mediciones por cada tratamiento (sacarosa o manitol).

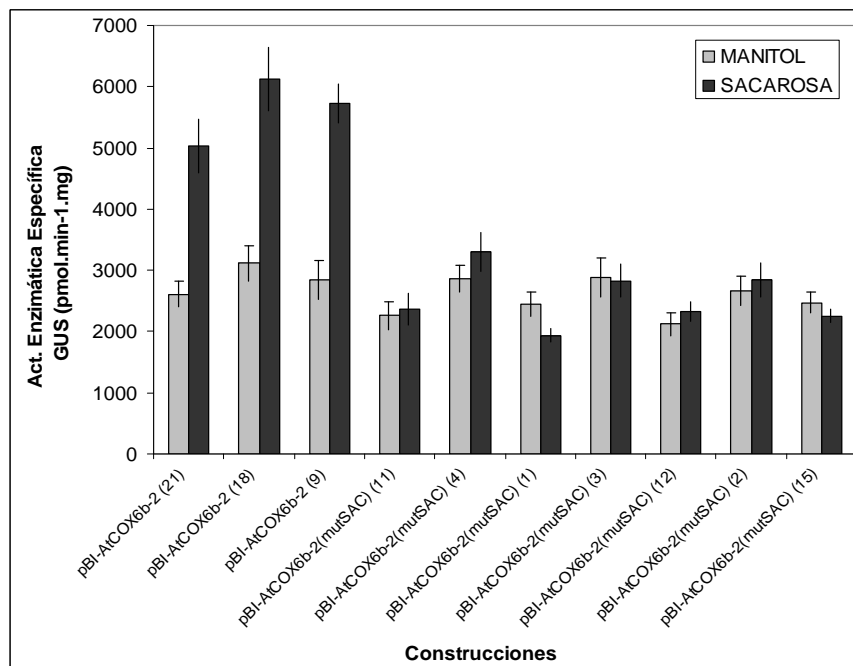


Figura 33: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con las construcciones pBI-AtCOX6b-2 ó pBI-AtCOX6b-2(mutSAC), incubadas en oscuridad. Se analizaron tres líneas independientes en el primer caso y siete en el segundo. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ y se realizaron tres mediciones por cada tratamiento (sacarosa o manitol).

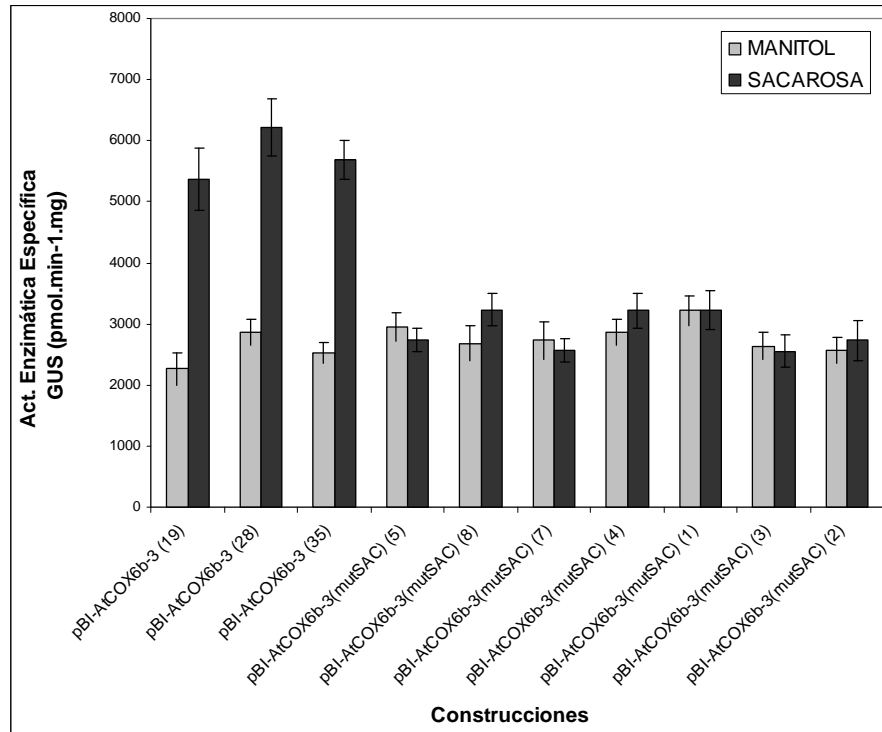


Figura 34: Niveles de actividad GUS en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con las construcciones pBI-AtCOX6b-3 ó pBI-AtCOX6b-3(mutSAC), incubadas en oscuridad. Se analizaron tres líneas independientes en el primer caso y siete en el segundo. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ y se realizaron tres mediciones por cada tratamiento (sacarosa o manitol).

Luego, se intentó determinar si las condiciones de iluminación ejercían algún tipo de influencia en la respuesta a sacarosa de los promotores estudiados. Por lo tanto, se crecieron plántulas que contenían las tres regiones promotoras con los motivos SURE2 intactos y mutados en medio MS-agar suplementado con sacarosa o manitol y en condiciones normales de iluminación (descriptas en el apartado 2.1.1.1 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos, luego de procesar las distintas muestras, se representaron en la figura 35.

Como se puede observar, el efecto causado por la sacarosa en el incremento de la actividad de los promotores analizados también se manifiesta en condiciones de iluminación y en una magnitud, con respecto al control, similar al detectado en oscuridad. Además, la falta de respuesta frente a la sacarosa al mutar los elementos SURE2 en estos promotores también se observó cuando las plántulas se crecieron en condiciones de iluminación.

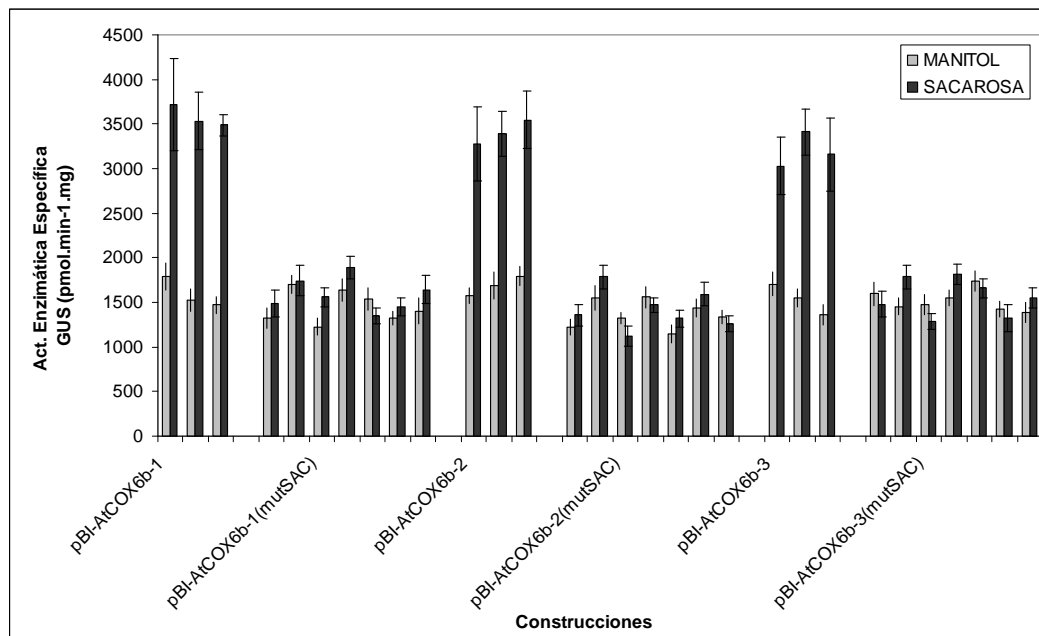


Figura 35: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con las construcciones detalladas e incubadas en condiciones de iluminación. Se analizaron tres líneas independientes (por cada construcción) de aquellas plantas que contenían los promotores intactos y siete líneas de aquellas plantas que contenían mutados los elementos de respuesta a sacarosa (SURE2). La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ y se realizaron tres mediciones por cada tratamiento (sacarosa o manitol).

4.1.2.5.3 Análisis de la respuesta de las plantas transformadas con las construcciones pBI-AtCOX6b-1 y sus acortamientos frente a giberelinas. Búsqueda de posibles sitios de respuesta a la hormona en el promotor del gen *AtCOX6b-1*

A través del ensayo con agentes físicos y químicos se pudo analizar el comportamiento de las plantas que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-1 frente a la incubación en presencia de giberelinas. Asimismo, observamos que el efecto estimulador ejercido por la fitohormona desaparecía al acortar la región promotora a 238 pb, lo que sugería que el ó los elementos vinculados a la respuesta estarían ubicados corriente arriba de esta secuencia. Por tal motivo, decidimos realizar el mismo ensayo pero incluyendo en este caso todos los acortamientos de este promotor.

De esta manera, se realizó el mismo análisis trabajando con tres líneas de plantas transformadas con las construcciones pBI-AtCOX6b-1, tres líneas transformadas con la construcción que contiene el promotor mínimo pBI-AtCOX6b-1(mín) de 238 pb, y 5 líneas de plantas transformadas con las construcciones que contienen las versiones acortadas de este promotor (689 pb y 458 pb) y que fueron denominadas pBI-AtCOX6b-1(ACORT1) y pBI-AtCOX6b-1(ACORT2), respectivamente. Los resultados obtenidos en este ensayo fueron representados gráficamente en la figura 36.

Como puede observarse en esta figura, la respuesta a giberelinas se detecta aún en las plantas que contienen los dos acortamientos y desaparece en las plantas que contienen el promotor mínimo (resultado observado anteriormente). Esto sugiere que el o los posibles elementos involucrados en la respuesta a la hormona se encontrarían entre 458 pb y 238 pb corriente arriba del codón de iniciación.

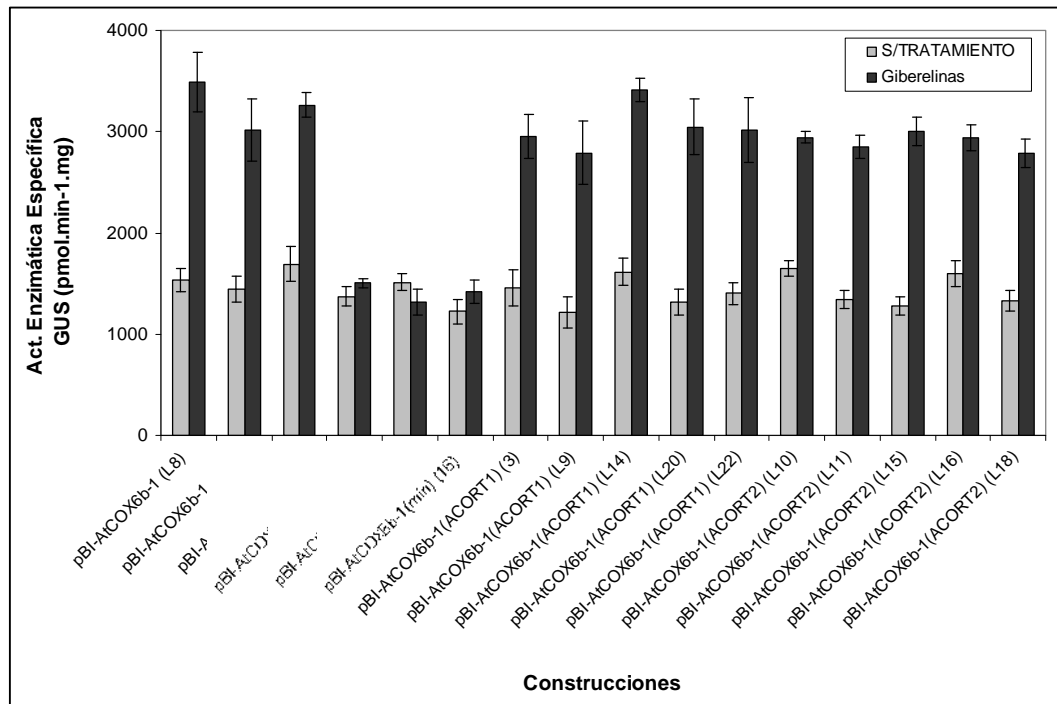


Figura 36: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con las construcciones detalladas e incubadas en MS ó MS suplementado con giberelinas. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ y se realizaron tres mediciones por cada línea y tratamiento.

Una observación minuciosa del promotor permitió detectar la presencia de tres copias de un elemento de respuesta a giberelinas, de secuencia 5'-CCTTTT-3', ubicados entre las posiciones -686 y -681, -304 y -299 (en la hebra complementaria) y -241 y -236, con respecto al sitio de inicio de la traducción. Este motivo fue previamente reportado en cebada (ver tabla N°3) y su posible funcionalidad será discutida más adelante.

4.1.2.5.4 Análisis de la respuesta de las plantas transformadas con las construcciones pBI-AtCOX6b-3 y sus acortamientos frente a citoquininas. Búsqueda de posibles sitios de respuesta a la hormona en el promotor del gen *AtCOX6b-3*

Anteriormente, observamos que las plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-3 respondieron a la fitohormona 6-bencilaminopurina (citoquinina). Asimismo, esta respuesta desapareció al acortar el promotor a 199 pb, sugiriendo que él o los posibles elementos involucrados en esta respuesta se encontrarían ubicados corriente arriba de esta región. Por tal motivo, se realizó un estudio similar al llevado a cabo con el promotor del gen *AtCOX6b-1*, empleando los distintos acortamientos de la región promotora del gen *AtCOX6b-3*. De esta forma, se incubaron en presencia de citoquininas las plántulas transformadas con las siguientes construcciones:

- pBIAtCOX6b-3: 1162 pb
- pBIAtCOX6b-3(ACORT1): 867 pb
- pBIAtCOX6b-3(ACORT2): 499 pb
- pBIAtCOX6b-3(mín): 199 pb

Los resultados obtenidos en este análisis se representan gráficamente en la figura 37. Como puede observarse en dicha figura, la respuesta a citoquininas se observó sólo en las plantas transformadas con las construcciones pBIAtCOX6b-3 y pBIAtCOX6b-3(ACORT1), lo que sugiere que él o los posibles elementos responsables de dicha respuesta se encontrarían ubicados entre los nucleótidos -499 y -867.

Una observación detallada del promotor permitió identificar cuatro copias de un elemento de respuesta a citoquininas (5'-GATTGA-3'), ubicadas entre las posiciones -775 y -770, -506 y -501, -324 y -319 y -70 y -65 (este último en la hebra complementaria), con respecto al sitio de inicio de la traducción. Este motivo fue previamente reportado en la bibliografía como un elemento de respuesta a dicha hormona en *Cucumis sativus* (ver tabla N°3) y su posible funcionalidad en el promotor del gen *AtCOX6b-3* será discutida más adelante.

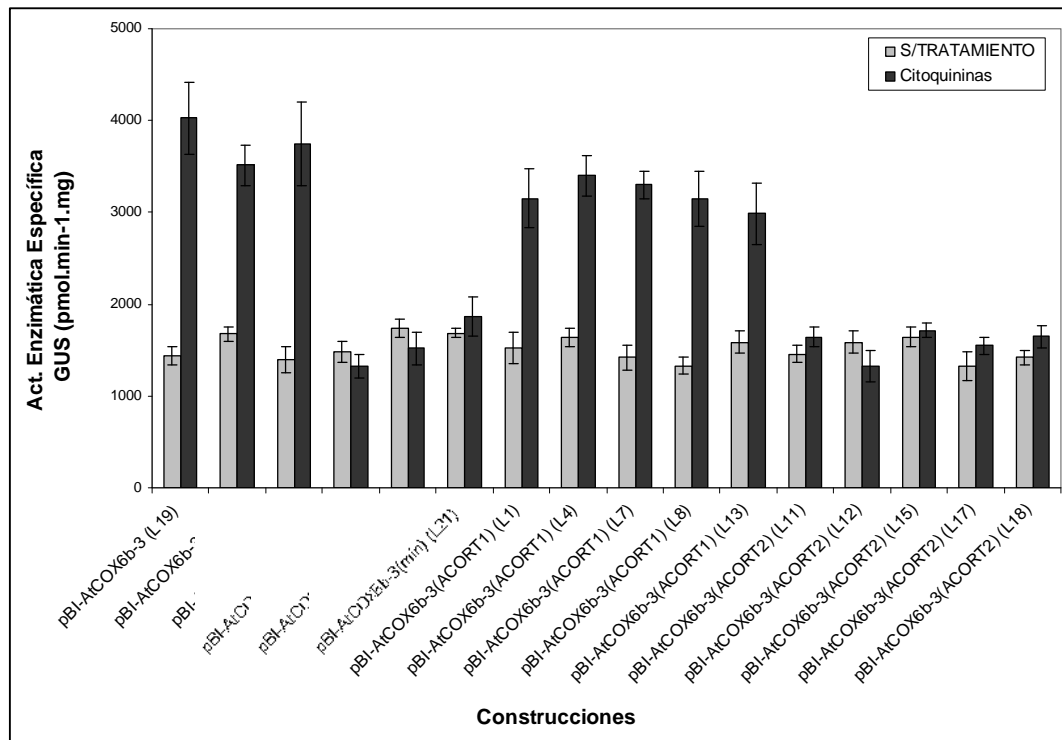


Figura 37: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con las construcciones detalladas e incubadas en MS ó MS suplementado con citoquininas. La actividad enzimática específica GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹ y se realizaron tres mediciones por cada línea y tratamiento.

4.1.2.5.5 Efecto de la mutación de los motivos *site II* de las regiones promotoras en estudio en la respuesta frente a distintos agentes físicos y químicos

Una vez evaluada la capacidad de respuesta de las plantas que fueron transformadas con las construcciones de interés frente a distintos efectores, nos interesó determinar si los elementos *site II* presentes en las regiones promotoras en estudio estaban involucrados en mediar estas respuestas. Por tal motivo, decidimos abordar nuevamente estos ensayos, pero teniendo en cuenta aquellas construcciones que contienen los promotores completos de cada uno de los genes *AtCOX6* con los motivos *site II* mutados. Empleando tres líneas independientes de cada construcción, se realizaron aquellos ensayos en los cuales las plantas que contenían los promotores con sus motivos *site II* intactos presentaron alguna respuesta.

En el caso de las plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6a (mutS2), los resultados obtenidos se representan en la figura 38.

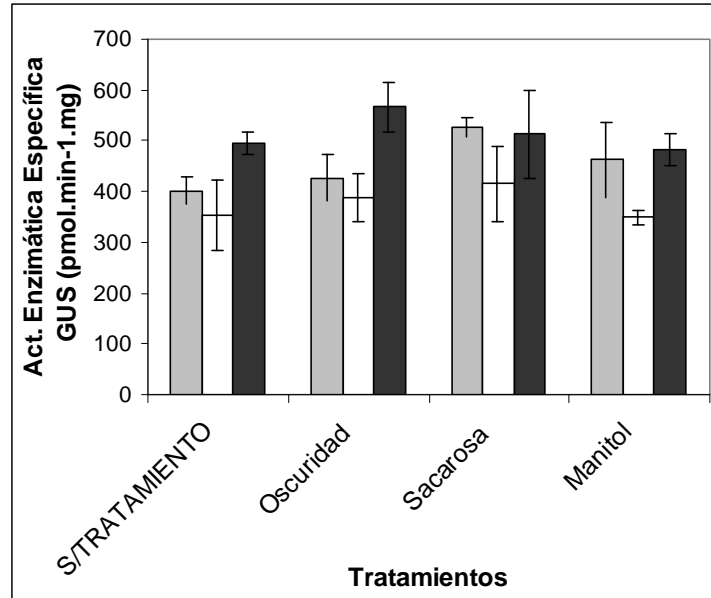


Figura 38: Análisis del efecto de la mutación de los elementos *site II* del promotor del gen *AtCOX6a* en la respuesta a distintos tratamientos. Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-AtCOX6a(mutS2). La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron tres líneas independientes y se realizaron tres mediciones por cada línea y tratamiento.

Como puede observarse en la figura 38, las plantas que contenían la construcción pBI-AtCOX6a(mutS2) resultaron “insensibles” al ser incubadas en oscuridad o en presencia de sacarosa, alcanzándose en estos casos niveles de actividad enzimática GUS análogos a los del control (sin tratamiento).

Un comportamiento similar se observó con las plántulas que contenían las construcciones pBI-AtCOX6b-1(mutS2), pBI-AtCOX6b-2(mutS2) y pBI-AtCOX6b-3 (mutS2) (figuras 39-41). Cabe destacar que, en el primero y último de estos casos, la ausencia de los motivos *site II* afectó además la respuesta de estas plantas a las fitohormonas, abonando aún más la idea de que estos elementos cumplen una función significativa en la expresión de los genes que los contienen.

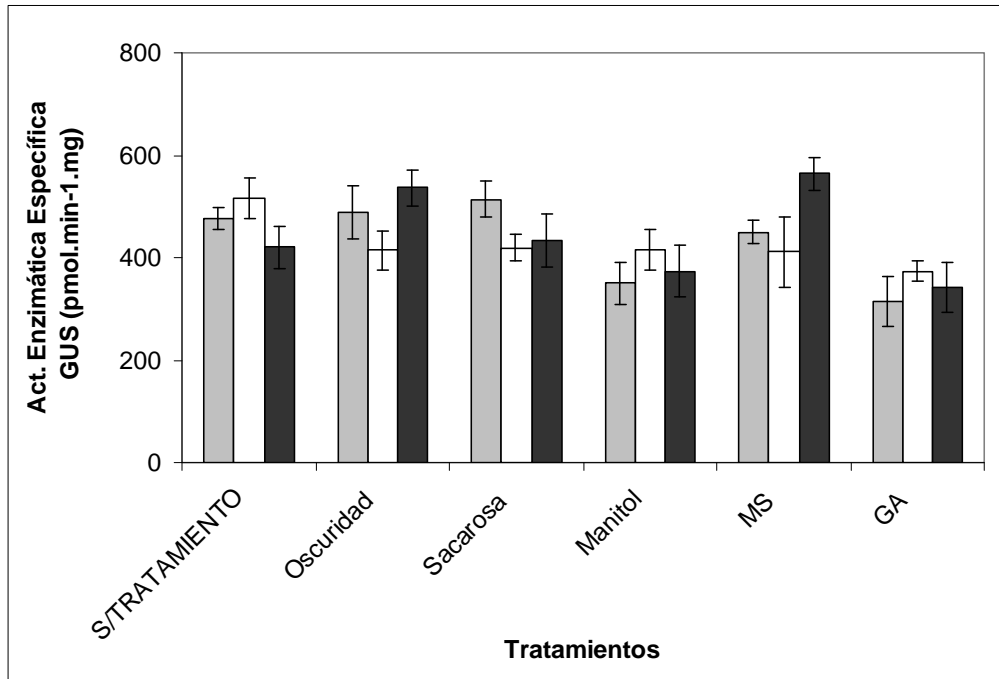


Figura 38: Análisis del efecto de la mutación de los elementos *site II* del promotor del gen *AtCOX6b-1* en la respuesta a distintos tratamientos. Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-*AtCOX6b-1*(mutS2). La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron tres líneas independientes y se realizaron tres mediciones por cada línea y tratamiento.

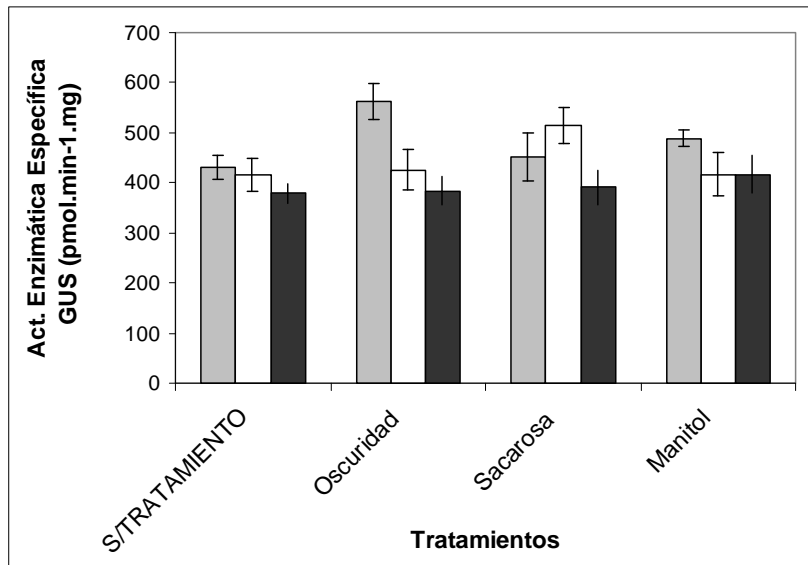


Figura 39: Análisis del efecto de la mutación de los elementos *site II* del promotor del gen *AtCOX6b-2* en la respuesta a distintos tratamientos. Niveles de actividad GUS en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-2(mutS2). La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron tres líneas independientes y se realizaron tres mediciones por cada línea y tratamiento.

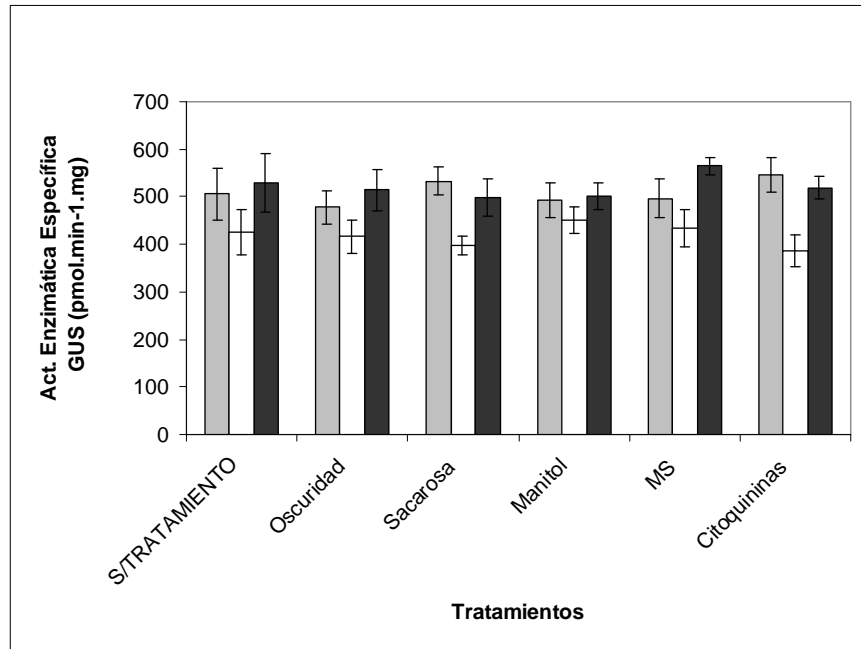


Figura 40: Análisis del efecto de la mutación de los elementos *site II* del promotor del gen *AtCOX6b-3* en la respuesta a distintos tratamientos. Niveles de actividad GUS en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-3(mutS2). La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron tres líneas independientes y se realizaron tres mediciones por cada línea y tratamiento.

4.1.3 DISCUSIÓN

La síntesis del complejo citocromo *c* oxidasa es un evento en el que participan dos genomas distintos: el mitocondrial y el nuclear. Por lo tanto se requieren mecanismos de regulación fuertemente coordinados que permitan alcanzar en forma correcta la biogénesis de este complejo (Mackenzie y McIntosh, 1999).

En plantas, las subunidades codificadas en el genoma nuclear (las menos caracterizadas hasta el momento) son AtCox5b, AtCox5c, AtCox6a y AtCox6b. En el presente trabajo se estudiaron las secuencias promotoras de los genes codificantes para estas dos últimas subunidades, de manera de establecer un análisis comparativo de la expresión que dichas regiones promueven.

Hasta el momento, no se cuenta con antecedentes de estudios funcionales realizados con las secuencias promotoras de los genes *AtCOX6a* y *AtCOX6b* de plantas. Este hecho motivó la realización de este trabajo, con el fin de alcanzar resultados que aporten al conocimiento que ya se posee acerca del complejo IV.

El primer análisis consistió en la búsqueda de “cajas” relevantes en las secuencias promotoras mencionadas. Los elementos identificados se resaltan en la figura 8. Si bien se ha podido detectar un gran número de motivos en las cuatro regiones promotoras, sólo tres presentan copias en todas ellas: 5'-AGAAA-3'; 5'-GTGA-3' y 5'-TGGGCC/T-3'. La secuencia 5'-AGAAA-3' se identificó por primera vez en el gen *lat52* de tomate. El ARNm transcrito a partir de este gen está constituido por unos 800 nucleótidos y ha sido detectado en órganos tales como anteras, polen y pétalos (Twell y col., 1989). La proteína que codifica es rica en residuos de cisteína y está involucrada en el proceso de esporogénesis. Más tarde, Twell y colaboradores encontraron que construcciones en las que se fusionaban regiones específicas del gen *lat52* de tomate al gen reportero *gus* mostraban actividad de la enzima β -glucuronidasa exclusivamente localizada en los granos de polen. Asimismo, se determinó que la expresión específica de este gen era regulada no sólo por la caja 5'-AGAAA-3' sino también por la secuencia 5'-TCCACCATA-3', ambas ubicadas en la región comprendida entre los nucleótidos -72 y -52 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Twell y col., 1991; Bate y Twell, 1998).

En este capítulo se hizo referencia, además, a la caja 5'-GTGA-3'. Esta secuencia fue detectada originalmente en el gen *lat56* de tomate entre las posiciones -96 y -93 con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Estudios realizados con una región promotora mínima del gen *g10* de tabaco (homólogo al gen *lat56* de tomate) que

involucraba las secuencias nucleotídicas ubicadas entre las posiciones -86 y -53, pusieron en evidencia la función esencial que cumple la misma en la expresión preferencial de este gen en granos de polen. Asimismo, se encontró que dicha expresión está íntimamente vinculada a la presencia de la secuencia 5'-GTGA-3' en la misma región (Rogers y col., 2001).

Teniendo en cuenta la simplicidad de las secuencias de estos elementos, no resulta sorprendente que la región promotora del gen *AtCOX6a* amplificada en este estudio contenga 6 motivos 5'-AGAAA-3' y 3 elementos 5'-GTGA-3'. Debido al enriquecimiento en estas cajas en el promotor mencionado, no se realizaron mutaciones puntuales de cada uno de ellos para verificar su posible funcionalidad, motivo por el cual tampoco se puede descartar un posible rol de estos elementos en la regulación de la expresión de este gen.

Con respecto a los elementos *site II*, estos han sido detectados inicialmente dentro del promotor del gen que codifica para el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (ANPC) de arroz, junto con repeticiones teloméricas internas (*telo boxes*). Los motivos *site II* poseen las secuencias 5'-TGGGC(C/T)-3', y se han observado usualmente entre las posiciones -120 y -180 con respecto al codón de iniciación. Por medio de la construcción de promotores mínimos se determinó que estos elementos actuarían en sinergia con otros motivos denominados *telo box*, dirigiendo la expresión en los tejidos meristemáticos, constituidos principalmente por células en activa división. Se ha encontrado, además, que los motivos *site II* son suficientes para activar por si mismos la expresión génica en estas células, no así los *telo boxes* (Trémousaygue y col., 2003). Se ha encontrado que los elementos *site II* son capaces de unir *in vitro* una proteína recombinante de *Arabidopsis thaliana*, conocida como AtTCP20, miembro de la familia TCP de factores de transcripción (Trémousaygue y col., 2003). Como se comentó anteriormente, la presencia de este motivo en varios genes de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial sugeriría una posible coordinación transcripcional a través de los mismos (Welchen y González, 2005; Welchen y González, 2006; Comelli y Gonzalez, 2009).

La región promotora del gen *AtCOX6a* contiene tres copias de elementos *site II*, ubicados entre los nucleótidos -141 y -146, -130 y -135 y -119 y -114 (estos dos últimos en la hebra complementaria), con respecto al sitio de inicio de la traducción. En el análisis histoquímico llevado a cabo con plantas transformadas con la construcción que contiene dicha región promotora fusionada al gen reportero *gus*, se observó que la enzima β -glucuronidasa se expresó sólo en polen. Cabe destacar que estos resultados fueron confirmados mediante la medición de la actividad enzimática GUS en extractos proteicos.

Si bien la expresión en anteras es una característica común a la mayoría de los componentes de la cadena respiratoria (Zabaleta y col., 1998; Ribichich y col., 2001; Elorza y col., 2004; Welchen y col., 2004; Comelli y Gonzalez, 2009), el patrón de expresión conferido por la región promotora del gen *AtCOX6a* no se ha manifestado para ninguna de las subunidades de la citocromo *c* oxidasa codificadas en el genoma nuclear de plantas, y por lo tanto resulta sorprendente, considerando que debería existir un control coordinado de la expresión de estos genes. La versión más corta de este promotor (162 pb) mostró el mismo patrón de tinción histológico que el promotor completo, sugiriendo que los motivos transcripcionales relevantes se encontrarían en esta región. Esta secuencia contiene dos elementos 5'-AGAAA-3' entre las posiciones -158 y -154 y -28 y -24 y dos copias del motivo 5'-GTGA-3' entre los nucleótidos -71 y -68 y -66 y -63 (en la hebra complementaria), siempre con respecto al codón inicial. Asimismo, incluye las tres copias de los elementos *site II*. Sin embargo, la mutación de estas últimas cajas no condujo a ningún cambio en el patrón histoquímico, a pesar de que las mismas fueron capaces de unir factores de transcripción provenientes de un extracto de proteínas de inflorescencias de coliflor. Este resultado sugiere que, posiblemente, los elementos 5'-AGAAA-3' y 5'-GTGA-3', u otras secuencias no identificadas, cumplan algún rol en la expresión de este gen, aunque sería necesario realizar mutagénesis sitio dirigida de estos motivos para poder confirmar su funcionalidad.

Cox13 es el gen nuclear que codifica la subunidad VIa del complejo IV en *Saccharomyces cerevisiae*. Mutantes nulas en tal subunidad revelaron un ensamblaje completo de la enzima pero con una disminución en su actividad. Asimismo, se observó que el ATP interactúa específicamente con la subunidad VIa modulando de esta manera la actividad enzimática (Taanman y Capaldi, 1993). Si Cox6a regula en plantas la actividad del complejo tal como ocurre en levaduras, *AtCOX6a* debería expresarse en otros órganos, considerando además que se ha detectado la presencia de su transcripto (Curi y col., 2003). Esto podría sugerir que existe cierta expresión en otros órganos además de polen, pero en niveles tan bajos que no pueden ser detectados por medio de los ensayos de actividad GUS. Otra posibilidad es que se hayan excluido elementos involucrados en la expresión de esta subunidad, ubicados corriente arriba de la región estudiada o corriente abajo del codón de iniciación.

Cuando se trataron plántulas transgénicas que contenían la construcción pBI-*AtCOX6a* con diversos agentes físicos y químicos, sólo detectamos un incremento de la actividad enzimática GUS al incubarlas en oscuridad y en presencia de sacarosa. Esta respuesta a la oscuridad se observó, además, al realizar el ensayo con las plantas transgénicas que contenían la versión más corta del promotor. Sin embargo, en este último caso no se detectó inducción al incubar las plántulas en presencia del azúcar, sugiriendo que él o los elementos responsables de esta respuesta se encontrarían corriente arriba de esta región del promotor.

Al realizar este ensayo con las plántulas transformadas con la construcción que tenía mutados los *site II*, la respuesta frente a ambos estímulos desapareció, sugiriendo que, posiblemente, estos elementos están involucrados en forma directa con la respuesta de dicha región promotora frente a esos efectores. Otra posibilidad es que estos motivos estén implicados en reclutar la maquinaria transcripcional que permite la expresión de este gen y, al estar mutados, este mecanismo basal se vea fuertemente afectado y por lo tanto también su capacidad de respuesta a estímulos.

Un estudio similar llevado a cabo con las plántulas que contienen la construcción pBI-*AtCOX6b-1* condujo a resultados marcadamente diferentes. El

análisis histoquímico llevado a cabo en las plantas transformadas con la construcción pBI-COX6b-1 evidenció la expresión de la enzima β -glucuronidasa en los haces vasculares, ápice y lámina de los cotiledones, en el meristema apical del vástago y en la raíz en plántulas de hasta 15 días de desarrollo. En plantas adultas la tinción se observó con gran intensidad en las venas, ápice y tricomas de la hoja, en la raíz y en la flor, principalmente en los granos de polen y en los pelos del estigma, conservándose esta última durante el desarrollo del fruto, que también evidenció actividad en su receptáculo.

Al observar en forma detallada la secuencia de la región promotora del gen *AtCOX6b-1* utilizada en este estudio, encontramos nuevamente un enriquecimiento en los motivos 5'-AGAAA-3', 5'-GTGA-3' y dos copias de los elementos *site II* entre las posiciones -213 y -208y -186 y -181 (en la hebra complementaria), con respecto al codón inicial. Como se comentó anteriormente, la escasa complejidad de secuencia que presentan las dos primeras “cajas” podría explicar la abundancia de las mismas en la región analizada. Por tal motivo, nos dedicamos a estudiar la funcionalidad de los motivos *site II*, empleando diferentes estrategias, que incluyeron deleciones sucesivas de esta región hasta el máximo acortamiento posible que los incluya y mutagénesis sitio dirigida de estos elementos sobre la versión completa del promotor. De esta manera, encontramos que tan sólo 238 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio de la traducción son suficientes para conferir el patrón observado con el promotor completo (1261 pb). Mas aún, el análisis cuantitativo reveló una actividad enzimática específica similar en las plántulas transgénicas que contenían las construcciones pBI-AtCOX6b-1 y pBI-AtCOX6b-1(mín), descartando la posible existencia de elementos en *cis* entre los nucleótidos -1261 y -239 implicados en la expresión basal de este gen. Para poder confirmar estos resultados, realizamos un análisis similar con las plantas que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-1(mutS2). La mutación específica de las dos copias de los motivos *site II* que contiene la región promotora condujo a un cambio radical en el patrón de expresión. En este caso, en plántulas de hasta quince días, observamos la presencia de una débil tinción en el meristema apical del vástago. En plantas adultas, la expresión sólo se conservó en flores y vainas. El análisis cuantitativo realizado con las

plántulas transgénicas que contenían las construcciones pBI-AtCOX6b-1 y pBI-AtCOX6b-1(mutS2) corroboró estos resultados, ya que como consecuencia de la mutación de los motivos *site II* observamos una severa reducción en los niveles de actividad enzimática específica GUS, alcanzando valores apenas superiores a los de los controles negativos. Un comportamiento similar se observó al realizar este análisis con los órganos de las plantas adultas que contenían estas construcciones.

Un tercer estudio, que incluía ensayos de unión *in vitro* y de competencia en geles de retardo (band shift) permitió concluir que los elementos *site II* de la región promotora de *AtCOX6b-1* eran capaces de unir factores de transcripción provenientes de un extracto proteico de inflorescencias de coliflor en forma específica.

Al igual que con el promotor del gen *AtCOX6a*, nos interesó determinar si las plantas que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-1 eran capaces de mostrar cambios en la actividad GUS al ser tratadas con distintos agentes. De esta manera, observamos un aumento en los niveles de la enzima, al doble aproximadamente, cuando las plántulas eran incubadas en oscuridad, y un incremento adicional en presencia de sacarosa. Asimismo, se detectó una respuesta positiva cuando al medio MS se agregó la fitohormona giberelina en una concentración final de 100 μ M. Por tal motivo, se nos planteó el interrogante acerca de la identidad de los motivos involucrados en la respuesta a estos efectores. Una primera aproximación consistió en someter a las plántulas que contenían los sucesivos acortamientos de dicho promotor a estos ensayos. Sólo las plántulas transformadas con las construcciones pBI-AtCOX6b-1, pBI-AtCOX6b-1(ACORT1) y pBI-AtCOX6b-1(ACORT2) mostraron respuesta frente a giberelinas, lo que permitiría concluir que los sitios putativos de respuesta a giberelinas estarían ubicados entre los nucleótidos -458 y -238. Entre las posiciones -304 y -299 (en la hebra complementaria) y -241 y -236, con respecto al sitio de inicio de la traducción, identificamos copias de un posible elemento de respuesta a giberelinas, de secuencia 5'-CCTTTT-3'. Este motivo fue inicialmente identificado en las regiones promotoras de genes que codifican la proteína hidrolasa y ha sido denominado "pyrimidine box". Estos genes mostraron ser inducidos por giberelinas en las células de la aleurona, luego de la germinación (Mena y col., 2002). Cabe mencionar, sin embargo,

que para poder atribuirle esta función a los mencionados elementos sería necesario mutarlos y evaluar nuevamente el efecto de esta modificación.

Por otra parte, a través de este estudio se puso en evidencia un incremento en la actividad del promotor de *AtCOX6b-1* cuando las plántulas eran incubadas en oscuridad y en presencia de sacarosa. La respuesta frente al azúcar no resulta sorprendente, ya que estudios previos realizados con los ARNm de *AtCOX6a* y *AtCOX6b-1* mostraron una respuesta notoria de estos genes al someter las plantas a este efector (Curi y col., 2003).

La respuesta observada en las plantas que contenían la construcción pBI-*AtCOX6b-1* al ser incubadas en oscuridad y en presencia de sacarosa se evaluó en aquellas plantas que poseían la versión más corta de este promotor (238 pb). En estas plantas, la respuesta se mantuvo prácticamente invariable, lo que sugiere que los elementos involucrados en la inducción se encontrarían contenidos dentro de esta región.

Al analizar esta porción del promotor encontramos un posible elemento de respuesta a la sacarosa, de secuencia 5'-TACTAA-3', entre los nucleótidos -197 y -192, con respecto al sitio de inicio de la traducción. Este elemento fue previamente identificado en el promotor del gen que codifica la proteína patatina de papa, con la secuencia 5'-AATACTAAT-3', en una posición similar a la mencionada y directamente implicado en la respuesta que presenta este gen frente a la sacarosa (Grierson y col., 1994). Por lo tanto, para poder dilucidar su posible funcionalidad, realizamos una mutación puntual de este elemento en el promotor del gen *AtCOX6b-1*. La construcción génica obtenida fue denominada pBI-*AtCOX6b-1*(mutSAC) y las plantas que la contenían no mostraron la respuesta observada previamente frente al azúcar. Este resultado permitiría concluir que este elemento estaría involucrado (en forma individual o en conjunto con otros elementos) en mediar la respuesta frente a la sacarosa en este gen.

El último análisis realizado con el promotor del gen *AtCOX6b-1* consistió en evaluar el efecto producido por la mutación de los elementos *site II* sobre la respuesta frente a los efectores considerados anteriormente. De esta manera, se pudo observar que

las plantas que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-1(mutS2) no evidenciaron cambios en la actividad enzimática GUS cuando dichas plantas fueron incubadas en oscuridad, ni tampoco en presencia de sacarosa o giberelinas. Un resultado similar se obtuvo al analizar esta modificación en el promotor del gen *AtCOX6a*. Esto refuerza la posibilidad de que este elemento esté involucrado en reclutar factores de transcripción que forman parte de la maquinaria basal de expresión de estos genes.

Cuando se abordó el estudio del gen *AtCOX6b-2*, el primer paso consistió, al igual que en los casos anteriores, en determinar el patrón de expresión conferido por su región promotora. El análisis realizado con las plantas que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-2 arrojó un resultado muy similar al observado con las plantas transformadas con la fusión entre el gen *gus* y la región promotora del gen *AtCOX6b-1*, tanto en plántulas de hasta 15 días de desarrollo como en órganos de plantas adultas. Más aún, la medición de la actividad enzimática GUS evidenció valores comparables entre las plantas que contenían estas dos construcciones. Cuando se evaluó el comportamiento de la versión más corta de este promotor (196 pb), los resultados fueron muy similares a los obtenidos con el promotor completo, sugiriendo que los elementos reguladores de la expresión de este gen se encontrarían ubicados en esta región del promotor. La presencia de cuatro elementos *site II* en esta secuencia, y la función observada previamente de estos motivos en genes relacionados, nos motivó a realizar mutaciones puntuales en ellos.

Como consecuencia de esta modificación, detectamos un cambio drástico del patrón de expresión del gen reportero. En plántulas, sólo fue posible detectar actividad enzimática en el meristema apical del vástago y ápice de los cotiledones, mientras que en plantas adultas, la tinción se visualizó en anteras y estigma de la flor, en la vaina y muy débilmente en el haz vascular de la hoja. Esta notoria alteración del patrón de expresión también se vio reflejada en los correspondientes análisis cuantitativos, que arrojaron niveles de actividad enzimática GUS muy reducidos en comparación con los alcanzados con las plantas que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-2. Para corroborar la funcionalidad de estos elementos, se realizaron ensayos de electroforesis en geles de retardo, empleando una región del promotor que incluía a estos motivos y el

mismo fragmento con estos sitios mutados. De esta manera, se pudo observar que estas “cajas” fueron capaces de reclutar *in vitro* factores de transcripción presentes en un extracto proteico de inflorescencias de coliflor y a su vez, mediante ensayos de competencia, se pudo verificar que esta interacción era específica.

Las similitudes entre los promotores analizados en este trabajo también se establecieron al estudiar la respuesta de las plantas que contenían la construcción pBI-AtCOX6b-2 frente a diversos agentes físicos y químicos. Al igual que con los promotores de *AtCOX6a* y *AtCOX6b-1*, aquí también se observó una notoria inducción cuando las plántulas fueron incubadas en oscuridad y en presencia de sacarosa. En este caso, sin embargo, la versión más corta del promotor no evidenció respuesta frente al azúcar, lo que sugeriría que él o los elementos implicados en la misma se encontrarían excluidos en esta construcción. Nuevamente, se realizó una observación de la secuencia ubicada corriente arriba del nucleótido -196 y se pudieron identificar dos copias del elemento 5'-TACTAA-3', inmersos en secuencias de 19 pb idénticas ubicadas entre los nucleótidos -318 y -300 y -257 y -239, respectivamente. Al mutar puntualmente estos elementos en el promotor completo de *AtCOX6b-2*, la respuesta frente a la sacarosa desapareció al incubar las plantas tanto en condiciones normales de iluminación como en oscuridad. Sin embargo, se conservó la activación del promotor observada al crecer las plantas en oscuridad.

Al realizar este análisis con las plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-2(mutS2), se observó que la ausencia de los motivos *site II* en este promotor producía una incapacidad de respuesta frente a los efectores estudiados, comportamiento observado previamente en los genes *AtCOX6a* y *AtCOX6b-1*.

Con respecto a las plantas que contienen la construcción pBI-AtCOX6b-3, el análisis histoquímico puso de manifiesto un patrón de expresión en plántulas y órganos de plantas adultas similar al observado para pBI-AtCOX6b-1 y pBI-AtCOX6b-2. Al igual que en estos casos, los acortamientos realizados a partir del promotor del gen *AtCOX6b-3* mostraron patrones de expresión muy similares a los observados con la versión completa del mismo. El mayor acortamiento realizado (199 pb) incluía dos

copias del motivo *site II* en su secuencia. Al ser mutados en forma puntual estos motivos, el patrón de tinción cambió severamente, en forma similar a lo descrito en plantas transformadas con la construcción pBI-AtCOX6b-2(mutS2). En geles de retardo, se pudo verificar que estos elementos en los promotores de los genes *AtCOX6b* son capaces de competir entre ellos por la unión de factores de transcripción provenientes de un extracto proteico de inflorescencias de coliflor, lo que refuerza la idea de un posible mecanismo común de expresión de estos genes. La similitud en cuanto al patrón de regulación también se puso de manifiesto en la respuesta de las plantas que contienen la construcción pBI-AtCOX6b-3 al ser incubadas en oscuridad y frente a sacarosa. Sin embargo, también se pudo detectar una notoria inducción cuando al medio de cultivo se lo suplementaba con citoquininas (6-bencilaminopurina; 0,1mM). En esta región promotora se pudieron identificar cuatro copias de un elemento de respuesta a citoquininas, ubicadas entre las posiciones -775 y -770, -506 y -501, -324 y -319 y -70 y -65 (este último en la hebra complementaria), con respecto al sitio de inicio de la traducción. Esta secuencia (5'-GATTGA-3') había sido previamente reportada en la bibliografía como un elemento de respuesta a dicha hormona en el gen *hpr-A* de *Cucumis sativus* (Jin, 1998).

A partir de los resultados obtenidos al tratar con citoquininas las plantas transformadas con los distintos acortamientos de este promotor, se podría sugerir que, si estos motivos son realmente funcionales, sólo las dos copias ubicadas en las posiciones más distantes con respecto al codón inicial estarían implicadas en la respuesta observada. Otra posibilidad es que el efecto estimulador por parte de la hormona requiera de la presencia de todos los elementos para que se produzca.

La inducción por esta fitohormona también se observó al realizar ensayos similares a los mencionados en este trabajo con las regiones promotoras de los genes que codifican citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana* (Welchen y Gonzalez, 2005, Welchen y col. 2009). Las citoquininas están involucradas en procesos de proliferación celular, por lo que se podría especular que *AtCOX6b-3* y otros genes de respuesta a esta hormona que forman parte de la cadena respiratoria mitocondrial se encuentran implicados en estos eventos. Sin embargo, la confirmación de esta hipótesis se debería

obtener a partir del análisis de plantas de *Arabidopsis* con niveles reducidos o incluso nulos de estas proteínas y la posterior evaluación de esta modificación en los procesos mencionados.

Además de la activación preferencial del promotor del gen *AtCOX6b-3* por citoquininas, se pudo observar una respuesta frente a la presencia de sacarosa en el medio de cultivo, similar a la mencionada previamente para los genes *AtCOX6a*, *AtCOX6b-1* y *AtCOX6b-2*. Un elemento de secuencia 5'-TACTAA-3' ubicado entre los nucleótidos -170 y -165 con respecto al codón inicial es requerido para la respuesta al azúcar. Por otra parte, la ausencia de las dos copias de los elementos *site II* en este promotor anuló la respuesta a efectores en forma similar a lo observado en los genes analizados previamente.

El rol de los motivos *site II* en los promotores de los genes analizados en este trabajo, puesto en evidencia mediante los ensayos de actividad GUS y de electroforesis en geles de retardo, sugiere que estos componentes de la cadena respiratoria mitocondrial estarían regulados en forma coordinada. Esta idea es reforzada por los efectos ejercidos por la sacarosa y la oscuridad. En el caso de los genes *AtCOX6b*, la respuesta a sacarosa estaría mediada, además, por un elemento conservado presente en sus regiones promotoras. Resulta notorio que en condiciones de oscuridad los niveles de hidratos de carbono en la célula, en general, se encuentran disminuidos. Sin embargo, en este trabajo se encontró que en estas condiciones se producía la activación de los promotores analizados. Esto sugiere que, posiblemente, los mecanismos que gobiernan la respuesta a oscuridad y azúcares involucran mecanismos independientes. Esta hipótesis también es soportada por el hecho de que tanto en condiciones de oscuridad como de iluminación la magnitud de la respuesta a la sacarosa es similar.

Por otra parte, la presencia de múltiples genes para una misma proteína en *Arabidopsis* plantea cuestiones interesantes acerca de sus orígenes y funciones. Los eventos de duplicación han sido frecuentes durante la evolución del genoma de este organismo (Blanchard y col., 2000). Se podría especular que aquellos genes que provienen de un evento de duplicación muy reciente son en general funcionalmente

redundantes y tienen patrones de expresión muy similares, mientras que aquellos genes que han divergido hace mucho tiempo han adquirido nuevas funciones y/o diferentes patrones de expresión. Un ejemplo que pone de manifiesto lo antes mencionado lo constituyen los tres diferentes genes que codifican la subunidad hierro-azufre del complejo II (succinato deshidrogenasa) mitocondrial, denominados *sdh2-1*, *sdh2-2* y *sdh2-3*. *Sdh2-1* y *sdh2-2* tienen un patrón de expresión similar en flores, pero las regiones que dirigen la expresión en anteras están diferencialmente localizadas en los dos promotores (Elorza y col., 2004). En cambio, *sdh2-3* se expresa específicamente durante el desarrollo de la semilla (Elorza y col., 2006). Por otra parte, *sdh2-2* se expresa también en el meristema apical de la raíz. Estos resultados ponen de manifiesto que *sdh2-1* y *sdh2-2* provienen de un evento de duplicación reciente, si tenemos en cuenta además su similar estructura intrón-exón, su elevada homología a nivel de aminoácidos (96%) y su similar presecuencia en el extremo N-terminal. Por otra parte, *SDH2-3* tendría un origen más antiguo debido a que posee una estructura intrón-exón diferente, codifica una proteína con una homología de sólo 67% con respecto a *SDH2-1* y *SDH2-2*, y posee una presecuencia N-terminal diferente (Elorza y col., 2004).

En *Arabidopsis*, la subunidad AtCox6b-1 tiene un tamaño de 191 aa, mientras que AtCox6b-2 y AtCox6b-3 presentan un tamaño menor, de 78 aa. Todas estas subunidades presentan una gran homología en el extremo C-terminal. Sin embargo, las regiones codificantes de *AtCOX6b-1* están separadas por cuatro intrones, mientras que las de *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3* están separadas por tres intrones. Además, AtCox6b-1 y AtCox6b-2 presentan un 76% de homología, mientras que AtCox6b-2 y AtCox6b-3 tienen un 95% (Ohtsu y col., 2001). Estos datos sugerirían que *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3* provienen de un evento de duplicación evolutivamente más reciente, mientras que *AtCOX6b-1* tendría un ancestro común más antiguo. Sin embargo, el solapamiento de los patrones de expresión de estos genes apunta a una posible redundancia génica, es decir, una situación significativamente diferente a la de los genes *sdh2*.

En arroz, por ejemplo, sólo existen dos genes *Oscox6b*. Los genes *cox6b-1* de arroz y *Arabidopsis* tienen una estructura intrón-exón similar, y las posiciones de los intrones en *Oscox6b-2* de arroz y *AtCOX6b-2* y *AtCOX6b-3* de *Arabidopsis* son las

mismas pero diferentes a las de *cox6b-1* en ambos organismos (Ohtsu y col., 2001). Estos resultados, considerados conjuntamente con las elevadas identidades de las secuencias aminoacídicas en el extremo C-terminal entre las proteínas Cox6b de arroz y *Arabidopsis*, sugieren que los genes *cox6b-1* y *cox6b-2* fueron originados antes de la divergencia de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas durante la evolución, mientras que *AtCOX6b-3* pudo haber emergido más tardíamente a partir de *AtCOX6b-2*.

A partir de los resultados obtenidos de las distintas experiencias realizadas en este trabajo, resulta evidente el rol de los elementos *site II* en la expresión de los genes *AtCOX6b*. Cabe mencionar que los promotores de los genes *Oscox6b* también presentan varias copias de estos elementos. Es posible, por lo tanto, que los patrones de expresión conservados en los genes *AtCOX6b* se expliquen como una consecuencia de la presencia de estos motivos.

La abundancia de estos elementos en numerosos genes que componen los complejos involucrados en la respiración aeróbica, constituyen una fuerte evidencia de la necesidad de un control, al menos a nivel transcripcional, que permita una expresión coordinada de aquellas proteínas implicadas en el desarrollo de una función celular común.

4.2 ESTUDIOS FUNCIONALES DE COMPONENTES DEL COMPLEJO DE UNION ENTRE EXONES DE ARABIDOPSIS THALIANA

4.2.1 Introducción

En nuestro laboratorio se han estudiado los mecanismos de regulación de la expresión de varias subunidades del complejo IV y del citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana*.

A partir de estos trabajos, se pudo establecer la presencia de ciertos elementos transcripcionales que resultan esenciales para la correcta expresión de los genes que los contienen. Entre ellos, los motivos *site II* se destacan no sólo porque se los ha identificado en un gran número de genes que codifican proteínas que forman parte de la citocromo *c* oxidasa y de otros complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, sino además porque su funcionalidad ha sido fehacientemente demostrada en muchos de estos casos.

Sin embargo, además de los elementos *cis* requeridos para la expresión de estos genes, en algunos casos se ha demostrado que resulta necesaria la presencia de otras secuencias, también ubicadas corriente arriba del codón inicial, para que el gen que las contiene se exprese de manera correcta. Tal es el caso de los genes que codifican la subunidad *AtCox5c* de *Arabidopsis thaliana*. En estos casos, el intrón ubicado en la región 5'UTR es capaz de promover elevados niveles de expresión mediante un incremento en la estabilidad del transcripto y en la eficiencia del proceso traduccional (Curi y col., 2005). Por este motivo, la importancia de los intrones *líderes* de los genes *AtCOX5c* despertó nuestro interés en determinar cuáles son los mecanismos que permiten la expresión mediada por los mismos.

Durante mucho tiempo se tuvo una visión muy errada acerca de los intrones, ya que se pensaba que estas secuencias, al no formar parte del producto final y ser removidas durante el procesamiento del pre-ARNm, eran tan sólo nucleótidos innecesarios en las moléculas de ADN y ARN. Hace tan sólo unas tres décadas, se

encontraron las primeras evidencias que pusieron de manifiesto que si bien los intrones debían ser removidos para que el gen se exprese correctamente, es el proceso de remoción *per sé* el que realmente cobra importancia en este sentido. De una manera análoga al reclutamiento de factores de transcripción por los elementos en *cis* de las regiones promotoras, los intrones, a través de ciertos “motivos” en su secuencia, permiten la interacción con proteínas que conforman un complejo conocido como *spliceosoma*. Este complejo no sólo es capaz de estabilizar al mensajero, sino que además se relaciona con otros procesos tales como el inicio y la elongación de la transcripción, la adición del nucleótido de guanina en el extremo 5', la poliadenilación en el extremo 3' y la unión de una serie de proteínas que en su conjunto conforman lo que se conoce como el complejo de la unión entre exones (EJC) (Le Hir y col., 2003).

El EJC ha sido extensamente caracterizado en humanos y *Drosophila melanogaster*, donde se le han atribuido funciones en el transporte y localización de transcriptos, en el aumento de la estabilidad de ARNm, como así también en la eficiencia traduccional. Sin embargo, es escaso el conocimiento que se posee acerca de su estructura y función en plantas. Esto impulsó nuestra motivación en tratar de dilucidar los mecanismos que regulan la expresión de algunos genes que codifican componentes de este complejo en plantas, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional.

Se ha demostrado que existen ortólogos de varios genes del EJC humano en plantas (Park y col., 2007). En particular, en *Arabidopsis thaliana* nos interesó abordar el estudio de tres proteínas del complejo: AtMago, AtY14 y AtPym. Cada una de ellas está codificada por un único gen en el genoma de la planta.

Mago e Y14 forman un heterodímero muy estable, tanto *in vivo* como *in vitro*, y constituyen parte del “núcleo” del EJC junto con MLN51 y eIF4A-III. Pym, en cambio, no se asocia en forma permanente con el complejo sino que, en humanos, se le ha atribuido una función de desestabilización de la interacción del EJC con el ARN mensajero (Gehring y col., 2009).

Por este motivo, nuestro estudio se centró en intentar determinar los mecanismos de expresión de estos genes y el efecto de la sobreexpresión de los mismos en la regulación génica mediada por intrones.

4.2.2 ESTUDIOS FUNCIONALES DE LAS SECUENCIAS PROMOTORAS DE LOS GENES *ATMAGO*, *ATY14* Y *ATPYM* DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

4.2.2.1 Búsqueda de elementos transcripcionales putativos en las secuencias promotoras de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM*

Al igual que con los genes *AtCOX6*, nuestro primer paso consistió en analizar las regiones promotoras de los genes de interés. Por tal motivo, realizamos una búsqueda de motivos transcripcionales comunes en todas ellas haciendo uso de las bases de datos de acceso público mencionadas en el capítulo anterior. Cabe destacar que en este caso no nos enfocamos en identificar elementos involucrados en la respuesta a factores físicos y químicos, sino sólo aquellos implicados en la expresión basal de estos genes.

Las secuencias de las regiones promotoras analizadas y el elemento común identificado en esta búsqueda se representaron en la figura 41. Como puede observarse, en los tres promotores estudiados se detectó la presencia del elemento *site II*, descrito en el capítulo anterior. Asimismo, cabe destacar que en el caso del gen *AtPYM* se identificó un intrón de 727 pb ubicado en la región 5'UTR del gen.

A

PromotorMagoF

AATTTTTTTGAAGGATACACCCCAATCAGAACTCCGGTTTAGAATGGAGTTAAACCAGAAAACCTCAAATCTGGCCA
 GACAACTTCTTCCACATGATAGAGTCAACGAAAAATGGTAAGACCTGTGCTAAGGATTATCCATGACCACAGAAAA
 AGACTCGGAATTAGTGTCTGAAGGAAAAAGCAAAATAGATCACAGAAAGAAGGGAATTTTAACCAACCTACGGCC
 AACAGAGCGGTTCCAACACAATACTTAAGTGCTTTCCAGAAGGAGATCGATTTGGTCTGTCAATTGACAAACATAAAGC
 ACCCGCATCAGATGGAACGGTAAAGTATACGGCCAATTATACATATACAGAAGTTGAGAACCCAACTATTTAATATT
 CGTCACCAGCTCACCAATAAAAAGTTCAAGACCAATA **GGCCCA**AGCAGTAACATCGTATCGCATCTGAAGATTACAGTG
 GCAAAAACTGATTATCGGATAACAGAGATGTCTAGCAAAACCCCATAGTTCTGGATAGCATGACCGATTTTCTAAATCT
 ATAATCGAGAAAAATATGTCAACCAAAAGATAATACATACCAGGAACTCAAAGCTGGATAAAAAATTTCCCTTTAACCA
 ATTACCATATGCCAGATTGACTGCAAAATCAAAATTTAAAAACATAAGCAGAACCTAGTAAGGCCTACGCTAGATGGG
 TCATGGGAAAAGATTGCTAGGACATCTGAAGGACCACTACTAGTAGAGTAAGATGAATAGAAGTAATTACCTAATCCCA
 AAGCTAGAATATTAGGAAGAGGACGAGTGCAAGTAAAGAAAAATGAACTGAAGACTGGTGAAAAGTACAAAGAAAAG
 TTTCCACTTGATTTCCAACTTTTTTTTTTCTGACAAACCAGTAGATTTTGGTCAAGTGGCAGTATATAGGAGAAAA
 CAGCCAACCAAGATGCATGTAAGAGATCCCAATTCCAAGGACATGGGAAGGACAAAGAATCAGATAGGGGAGTCAGAA
 GTGTGGTATGGAAAGAAGCACTAAAGGAACCTCATACTGAATCCGAAAAATCTTAGTGTGGACAATATGATGC **AGC**
CCAACACCAAACGAGCTGCAAGACAAAATGATAAACTATGATGTGAATTGGTTTTGTCTGTGTTTAGGGGAAAATAG
 TTAGCGATTCATTAAGGAATTATATAGGGAGGGAGAAACAGAAGAGAAACCTGCAACAAGGCTATAAACCTTGGGGAA
 GCCAAGGCAGCTGATAATTGATACAAACAGGTGATGCAAAAAACAGAGACTATGAAGGCTCTGCAAGAACAATCAGAG
 TGGAATAAAAAAAAAAACCATCCACTAATGTATAATGATAAAAAAAAAAACCATCAACAGGTGATGCAAAAAACAGAGAC
 GAAATTCAACAGCCCTCCTTACCAATAAAAGTTTCGAGGGACAACACCGGGGAACCTCAAATGATCATACTGATAGGAA
 AAAAAATAAAGACAGAAAGTCGGTAAAAATGACATCACTCTAGAGATAAAAAAAAAAAGAGTAAAGCTTACAGAGAAG
 AAGTAAAAAGAGAGGTCCTCACAGAGTCCAATGATGGCGATGGTAAAGAATGTCTGTCATTGACTTGAGACGAGTG
 AAACGGTTTCAGTAAAACGGAGAAAGAGTGTGACTCTAAATACTTTGAAAACCTACCTGAACGTTGAAGCTCTCTTCC
 ACCTTAGTATATGGTGCCATGACCACATAGATTGCAGCTACAGATCCAGAATCAAATCATATCCTGCTCCACCAAT
 CGAAAGTTTCAGTTATATAAAAAAGAAAAAGAGATCATCTGGCCGCTAAGAAGACGAAACGAAGAAATTACCATAG
 GATTGAAGAACTTGCCATTTTTCGAATCCGTCGGCATCGTCTCTGTATCGGGGAATCGGAAATCAGGCAGCCCGGAT
 ACACACACAATTTTCGATGGAAACAGAAAACTAAAC **TGGGCC**TTAACTTTTCGGGTTACAAATGGGTTCT **GGCCCA**A
 TATGTA **AGCCCA**TTACCTTTTTTCTTTTTCGGGGACGGACTTAAAGAAGGGCaaaggacacggagaggtaatctcgat
 ctcgagaaagaaagaaaaaagagaaggc **atg**

pMagoAcortF

PromotorMagoR

B

PromotorY14F

AGTCAGGACCAAAAAGCAATTCGAATCAAATCTCTTTGTTCCATGTCCTTGCAAGAGAAAATAGTCAATGACTCTGGAAG
 CGTTCTCAAGTTCGAAAGTTCGATCTTTGAAAAGATTATTGAAGTTGGGTCGCCAGGATCCATGGCCGGAGAAGTTT
 TGTFTTTCCCAAGATGGTGAAGAAGACGAAGAGAAAAAGGTGAAGGCTCTTTTGGGTTTGCCTTAAATCATAA
 ATGTATGTTCTTTTAGAATTTTGTATGATTTTGTCTTTGTAAAAAGCATTTAGCAAAAAACAATTTTTTTTAAAA
 ATCGAACCTTTTTTGTFTTTTATTGTTCTTTGAAACTGTTATCGATTTTATAGGATATTCAGTTTCGTAAAGAGCGAG
 ATTAGAATGGAAAGAAATCATATATATTGACCTGATTATTTTGGCAAATTAAGAGCATTACAGATTTTAAAAAGATT
 GTAGTAACAGATTTTAGTAGGTATCAACACTATGTATTCCTTTTTTCATGGATAAAGTAGCTTTTTCAATACATTGTT
 TTCGTTTTTGTFTTTTATTAGATTGATTGTTAGAAGAACAATTTATATTGCAGTAAAAGATTATTGGAGAT
 AATTAATTTAGTTAAAATAATTTATATAAAGTAATTTTATAGTTAACTAAATTTTGACCCCAAAAAA
 GAAATCTTGGTCTGCCACTTCTATACTCTATACTAATAAAGATTTTAGTTTCTTCACTATAGTAATGGGAATCAC
 TTGGTTCCAACAAAATTGATAATTCAACTGTTTGGTGGATTTAATTTTTTTTTCTCCAAACTCTTTGGCGTTACA
 ACCTGCAAGTAAAAGGGGAAAAATGAGGTCAAAAACCTATCAAAAAACAAAACCAATGAATAAGGGCCAGGCTTAT
 CCCTGAACATAGCTAAGTGAAACTAGCATTGTGATGTATAGATTATATAAATCTTAGGACCTGCCGTAAAGAAAA
 GTATACTCTATAAATATTAGGACCTGCCCGTAAAATATTTTTTGGCCCTAACTCTCATGACCGGGCCAGCTAAAGACA
 AACGGTCACTGAACTGTGAAGTCTACTATTTTATAGTATAGGGCTCATCGACAACAATTACCTATCCCATCCATAA
 AACAAAATTTGTCAGGCAGCTGTTCTTTTCCCGTCACACAAAACCTCGCGCATGACATTAATTTTTCTCAACACT
 GTAACGAGTGTACGGTCTTCGGTACTTCAATTTCCAAATCCTACCCGTTAAGATTATCTTTAGATATTATATCAACGG
 TCGATATAGCTTCTTAAAGGACACGTGTGTTGTTAAATAGTTGTCGTAAATTGACCAGAGTTTGTACTACTTTAGTC
 AACAGAACCAGACAATAAATGTTTCCAAATTAATGCTCTCCCTCCTCTAAATGACGTAAGTAATTTATGGCGACGA
 ACTAAGATTTGTTTCTTAAATGCTTTGCATCTCTATGTTTCTTTCTTTAGAATTTGGTGAACATGTTGGACGA
 GATTTATTTGAGATTAGAGTGGGAATTAGAAAGCAATATTGACTATAATGATTGTATGCAAACGGATAAAACAATGA
 TGATCACCATCAAAGAGATGGACCAGTATCGACTGTAAAGTGTAAATACCACAATATGATTGATGATATCCTAATTA
 TGAAGTGATACAATAATTGACATCATGAATGCTTAAAAAGGTATGCCATGATTCACTCTCGACATATGAAATTCAGA
 TAATGTAACATTAACAAGAGAAGTTTTTCATCAAAGGCTTAAGCCTGTTTGTAAAGAAACCTAAAAAATCAAAGGCTTA
 GCTTACTCTGAAGCGTGAAAGAATAAATAAAAAAGTAAAGAGCCCAAAATAAGCCCACTAACATTGACGAGAGGAGTT
 TAATCAAAGCCTGTTTAAAAGGGAAAAGGAAAACTAGCGTGAGAAAGAAATACAAGCGTAAAGAGCCCAAAATAAGCC
 CACTTAAGGTCCAATATATTCCTATAAACAACTGGCAGAGAAATATCTTGatagaagaagagctccgtcccaaa
 aacaaaggaaacaaaaaatcagtcggcgaaacgggaagagatctatcggaatcttacggcgcggaagtc**atg**

pY14AcortF

PromotorY14R

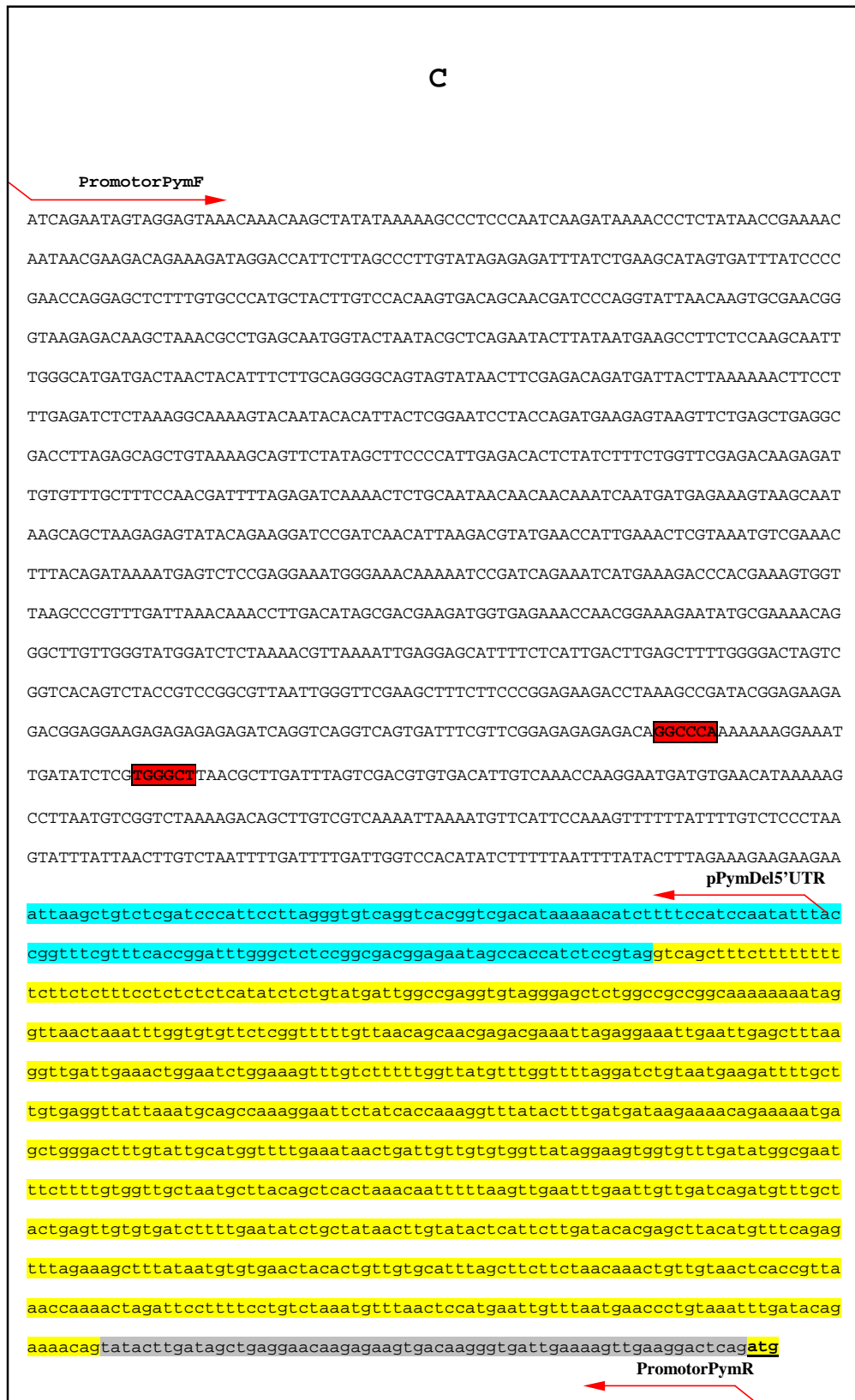


Figura 41: Secuencias nucleotídicas de los fragmentos clonados de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM*. En mayúsculas se indican las regiones promotoras, mientras que en minúsculas se identifican las regiones 5'UTR completas de cada gen. Las flechas en color rojo señalan los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de ADN clonados en las construcciones pBI-AtMago (A), pBI-AtY14 (B) y pBI-AtPym (C), que se describen más adelante. Asimismo, se señalan los oligonucleótidos específicos empleados para realizar los acortamientos correspondientes de los promotores de *AtMAGO* y *AtY14*. En rojo se resaltan los elementos *site II* identificados en cada secuencia a partir de la búsqueda en bases de datos. En negrita, resaltado en amarillo y subrayado se indica el sitio de inicio de la traducción (ATG) de cada gen. En (C) se resaltan: en celeste, el exón 1, en amarillo, el intrón líder y en gris, el extremo 5'UTR del exón 2 del gen *AtPYM*. Las bases de datos empleadas fueron: http://www.bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/BAR_Promomer.cgi; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/> y <http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtcisDB/>.

4.2.2.2 Clonado de las secuencias promotoras de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM* en pBI101.3

Para el clonado de cada región promotora se procedió a realizar la amplificación de las mismas, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.1.1 de Materiales y Métodos.

De esta manera, se purificaron fragmentos de ADN de 2135 pb, 2177 pb y 2253 pb correspondientes a los promotores de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM* respectivamente, que incluían sus regiones 5'UTR completas en todos los casos. Dichos fragmentos fueron digeridos con las enzimas *SalI* y *BamHI*, *SalI* y *XbaI* o *XhoI* y *XbaI*, respectivamente, como se describe en el apartado 2.2.3, y ligadas al vector pBI101.3 (ver punto 2.2.4) previamente digerido con las mismas enzimas o compatibles con éstas. Los vectores obtenidos de esta manera fueron denominados: pBI-AtMago, pBI-AtY14 y pBI-AtPym.

Todas las construcciones en pBI101.3 se utilizaron para transformar células de *Escherichia coli* de la cepa DH5 α (Hanahan, 1983). Se realizó minipreparación de ADN plasmídico (ver 2.2.6.1) con las colonias obtenidas y el ADN se analizó por digestión con las enzimas de restricción que reconocían sitios internos de cada fragmento. Posteriormente, se determinó parcialmente la secuencia de los fragmentos

clonados para verificar su identidad, utilizando oligonucleótidos adecuados y siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.7.2 de Materiales y Métodos.

El ADN plásmídico obtenido previamente se empleó en la transformación de células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa CV2260) y plantas de *Arabidopsis thaliana* de manera análoga a la descrita en el capítulo anterior.

Por otra parte, se amplificaron fragmentos más cortos de los promotores de *AtMAGO* y *AtY14*, de 521 pb y 473 pb, respectivamente, que incluían los elementos *site II* más cercanos al codón inicial. Las construcciones obtenidas al ligar estos fragmentos al vector pBI101.3 fueron denominadas pBI-AtMago(ACORT) y pBI-AtY14(ACORT). Asimismo, se realizaron mutaciones puntuales de los elementos *site II* ubicados en las posiciones que se mencionan a continuación, asignándoles a las construcciones obtenidas las siguientes denominaciones:

- pBI-AtMago(mutS2-2): Fragmento del promotor del gen *AtMAGO* con los elementos *site II* de las posiciones -114 y -101 mutados.
- pBI-AtMago(mutS2): Fragmento del promotor del gen *AtMAGO* con los elementos *site II* de las posiciones -148, -114 y -101 mutados.
- pBI-AtY14(mutS2-1): Fragmento del promotor del gen *AtY14* con los elementos *site II* de las posiciones -265 y -254 mutados.
- pBI-AtY14(mutS2-2): Fragmento del promotor del gen *AtY14* con los elementos *site II* de las posiciones -164 y -153 mutados.
- pBI-AtY14(mutS2): Fragmento del promotor del gen *AtY14* con los elementos *site II* de las posiciones -265, -254, -164 y -153 mutados.
- pBI-AtPym(mutS2-1): Fragmento del promotor del gen *AtPYM* con el elemento *site II* de la posición -1179 mutado.
- pBI-AtPym(mutS2-2): Fragmento del promotor del gen *AtPYM* con el elemento *site II* de la posición -1151 mutado.

- pBI-AtPym(mutS2): Fragmento del promotor del gen *AtPYM* con los elementos *site II* de las posiciones -1179 y -1151 mutados.

4.2.2.3 Análisis de las plantas transgénicas

4.2.2.3.1 Selección y análisis de las plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas

Las semillas de las plantas transformadas fueron sometidas a un proceso de selección con el antibiótico kanamicina como se describe en el apartado 2.2.9.2 de Materiales y Métodos. Las plantas sobrevivientes fueron transplantadas a tierra y en unas 15 de ellas se procedió a verificar la presencia del transgén por PCR. En estas reacciones se utilizaron los mismos oligonucleótidos empleados en la obtención de los clones positivos de *Agrobacterium* previamente descrita. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1,2 %) con los productos de PCR de cada ensayo, detectándose en todos los casos la presencia de una banda del tamaño esperado, lo que indicaba que la selección con el antibiótico funcionó adecuadamente (ver 2.2.9.3).

La tercera filial (y subsiguientes) de aquellas plantas que resultaron positivas en este análisis se emplearon para los estudios de expresión que se detallan a continuación.

4.2.2.3.2 Análisis histoquímico de la expresión del gen *gus* en plantas transgénicas

4.2.2.3.2.1 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtMago

A partir de plántulas de *Arabidopsis* en las que la presencia del transgén había sido confirmada, se procedió a realizar la detección de la expresión del gen reportero *gus* siguiendo la metodología descrita en el punto 2.2.9.4.1. El patrón de tinción obtenido con las plantas que contenían la construcción pBI-AtMago se ilustra en la figura 43. Como se puede observar, la expresión del gen reportero bajo el comando de

la región promotora del gen *AtMAGO* se detectó en el meristema apical del vástago y de la raíz, en las venas y ápice de los cotiledones y en las venas de la primera línea de hojas de plántulas de hasta 20 días de desarrollo. En plantas adultas, la actividad GUS se puso en evidencia en los granos de polen y en las venas de los sépalos, en las venas de la hoja, en la raíz y en el estigma.

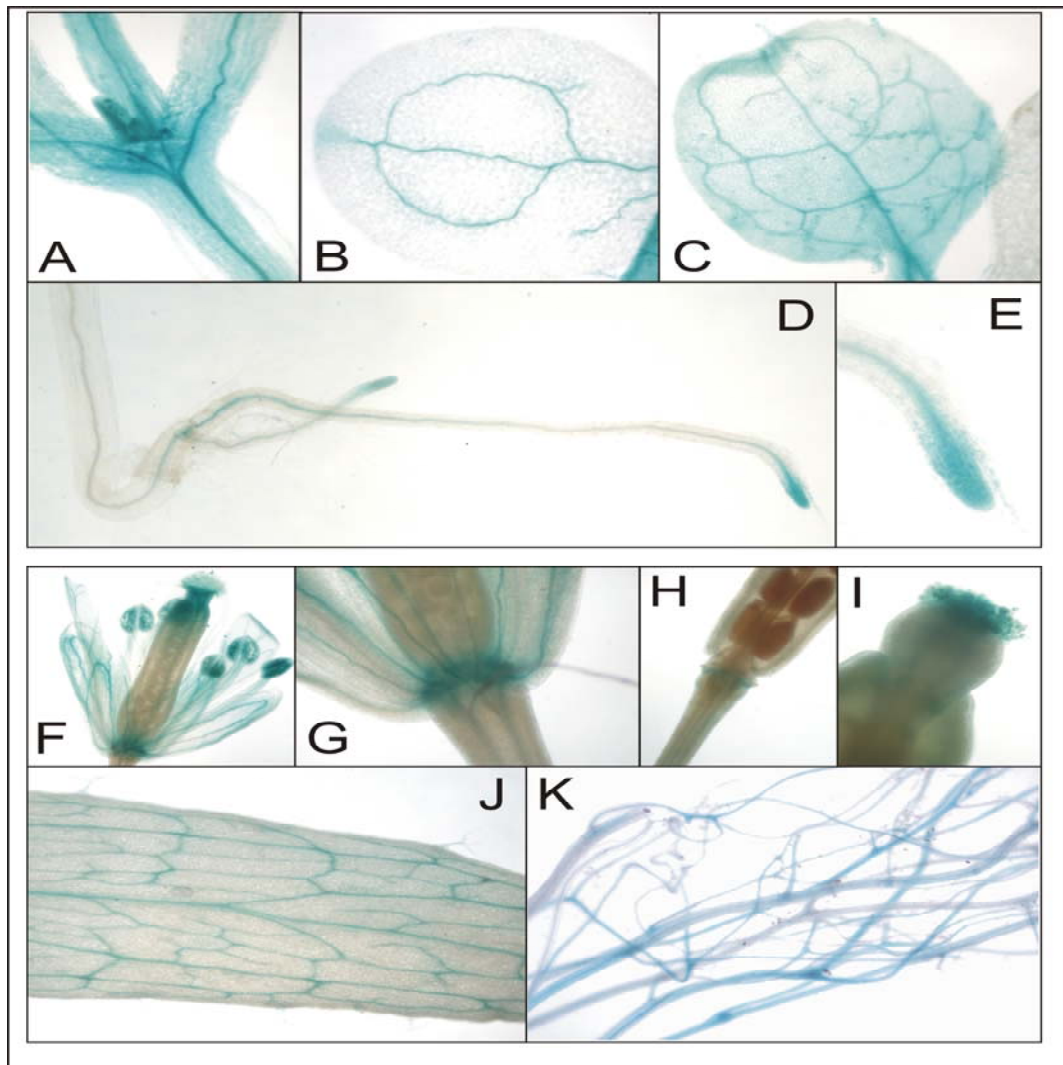


Figura 43: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtMago. Las plántulas fueron crecidas en placas de Petri con medio M-S agar con kanamicina. Cumplidos los distintos períodos de desarrollo, las plántulas fueron cosechadas y sometidas a ensayos histoquímicos de actividad GUS. En plántulas de 15 días, A) meristema apical del vástago; B) cotiledón; C) hoja; D) y E) raíz; F) flor; G) receptáculo de la flor; H) e I) receptáculo y estigma de la vaina, respectivamente; J) hoja; K) raíz.

4.2.2.3.2.2 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtY14

El patrón de tinción observado en las plantas transformadas con la construcción pBI-AtY14 (figura 44) resultó muy similar al de aquellas que contenían la construcción pBI-AtMago. Es decir, en plántulas de hasta 20 días de desarrollo la presencia del gen reportero se puso en evidencia en el meristema apical del vástago y de la raíz y en las venas de los cotiledones y de la primera línea de hojas. En plantas adultas, se detectó tinción en los granos de polen y venas de los sépalos, en las venas de las hojas, en la raíz, en el receptáculo y en el estigma de la vaina.

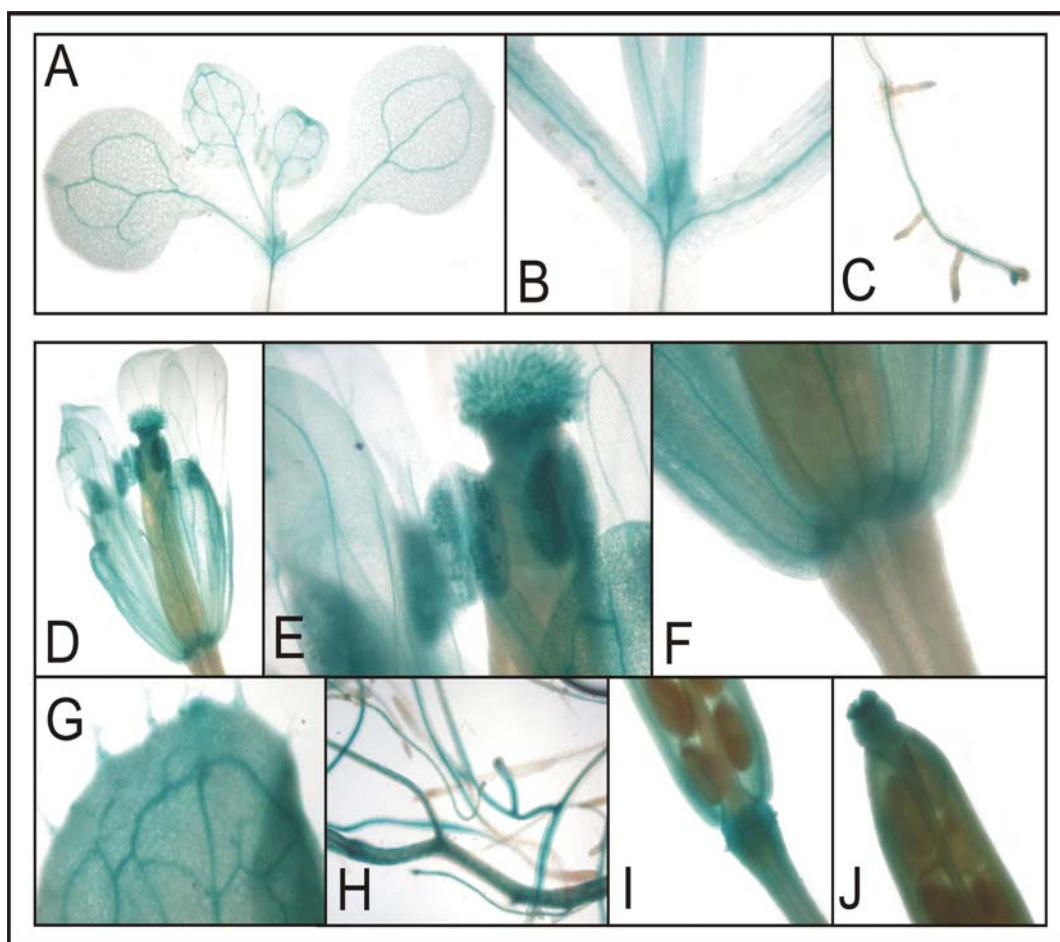


Figura 44: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtY14. En plántulas de 15 días, A) cotiledones y primera línea de hojas; B) meristema apical del vástago; C) raíz; D) flor; E) anteras y estigma; F) receptáculo de la flor; G) hoja, H) raíz; I) y J) receptáculo y estigma de la vaina.

4.2.2.3.2.3 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtPym

Las plantas que contenían la construcción pBI-AtPym presentaron un patrón de actividad enzimática GUS muy similar a aquellas transformadas con las regiones promotoras de los genes *AtMAGO* y *AtY14*. Esto no resulta sorprendente si se tiene en cuenta que las tres proteínas codificadas por estos genes forman parte de un mismo complejo.

En la figura 45 se ilustra el patrón de expresión del gen *gus* en las plantas transformadas con la construcción pBI-AtPym. En plántulas de hasta 20 días de desarrollo la tinción se evidenció en las venas y lámina de los cotiledones y de la primera línea de hojas, como así también, con gran intensidad, en la raíz. En plantas adultas la expresión del gen reportero se detectó en venas y lámina de la hoja, en los granos de polen, venas de los sépalos, receptáculo y estigma, y en la raíz.

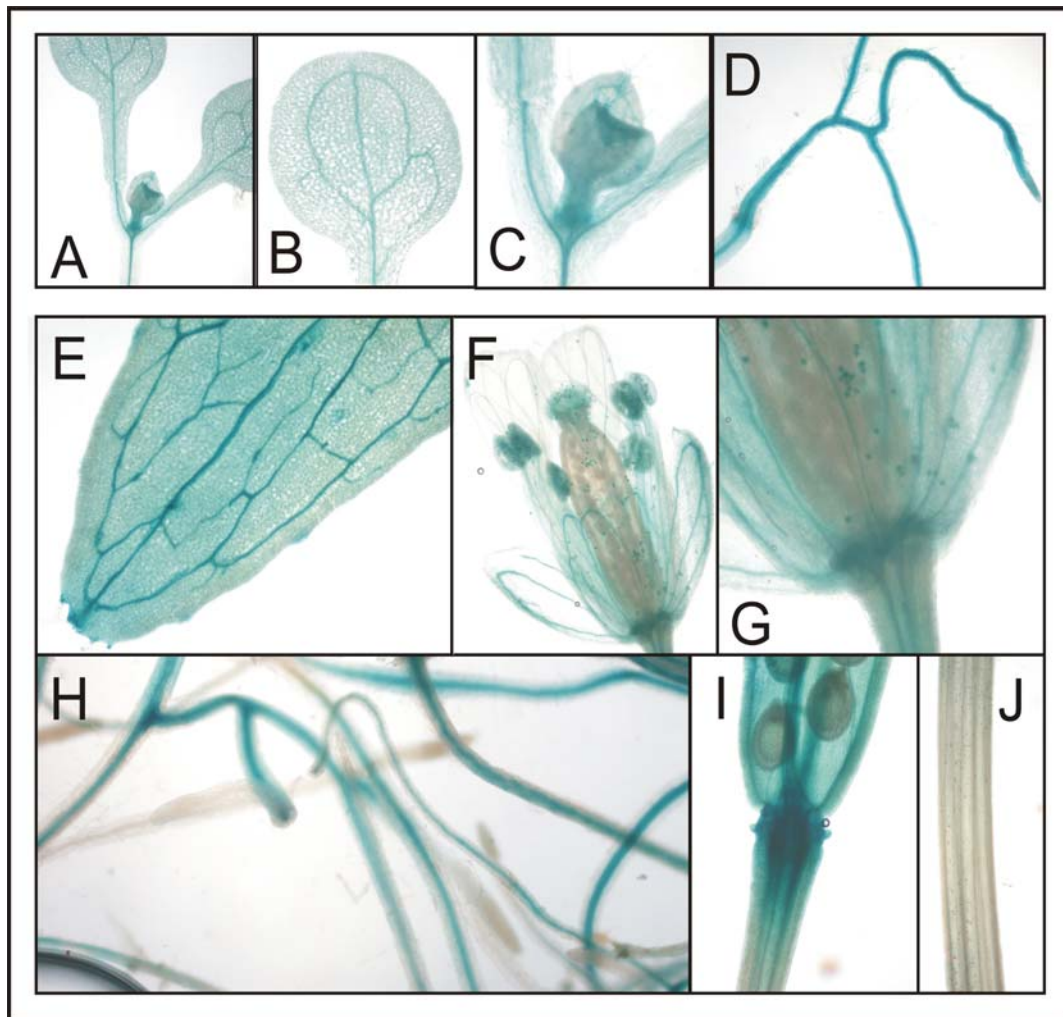


Figura 45: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtPym. En plántulas de 15 días de desarrollo, A), B), y C) meristema apical del vástago, cotiledones y primera línea de hojas; D) raíz. En plantas adultas, E) hoja; F) flor; G) receptáculo de la flor; H) raíz; I) receptáculo de la vaina; J) tallo.

4.2.2.3.2.4 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtMago(mutS2-2)

Una vez determinado el patrón de expresión de las plantas que contenían la construcción pBI-AtMago, decidimos realizar el mismo análisis con las plantas transformadas con las construcciones pBI-AtMago(mutS2-2) y pBI-AtMago(mutS2).

En ambos casos, no se observó tinción en ninguno de los órganos de plántulas de hasta 20 días de desarrollo o de plantas adultas (figura 46).

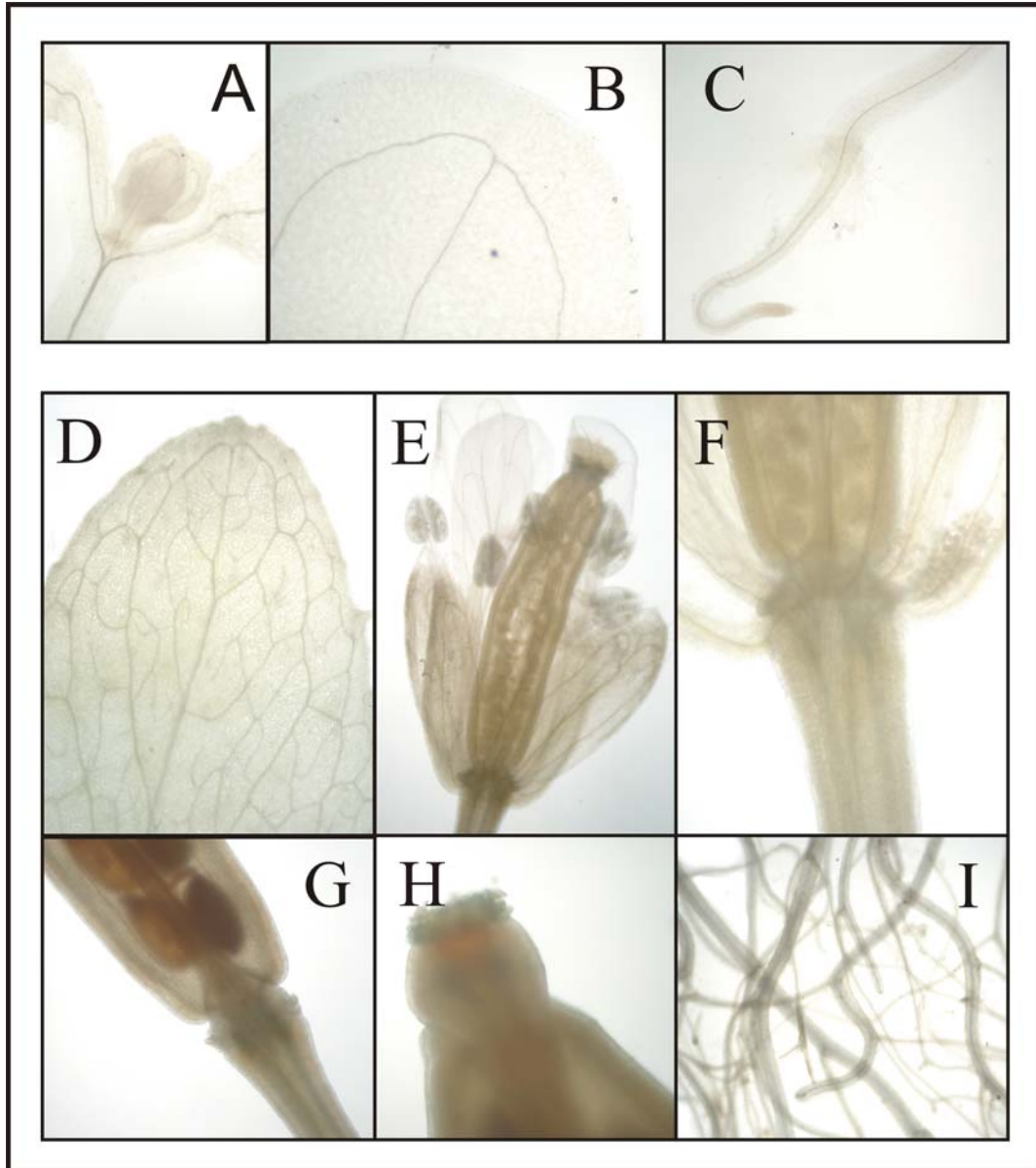


Figura 46: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtMago(mutS2-2). En plántulas de 15 días de desarrollo, A) meristema apical del vástago; B) cotiledón y C) raíz. En plantas adultas, D) hoja; E) flor; F) receptáculo de la flor; G) y H) receptáculo y estigma de la vaina; I) raíz. El mismo resultado se obtuvo con las plantas transformadas con la construcción pBI-AtMago(mutS2).

4.2.2.3.2.5 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtY14(mutS2-1)

En el caso del promotor del gen *AtY14*, la mutación de los elementos *site II* se realizó en forma sucesiva, debido a que el mismo posee cuatro copias de este motivo ubicadas de a pares y contenidas en una secuencia conservada de unos 24 pb. Al mutar aquellos sitios más alejados del codón inicial, el patrón de expresión del gen reportero *gus* obtenido fue el que se ilustra en la figura 47.

Como se puede observar en esta figura, en plántulas de hasta 20 días de desarrollo la tinción se detectó en las venas de los cotiledones y en los meristemas apicales del vástago y de la raíz. En plantas adultas, la expresión se evidenció en las venas de las hojas (aunque muy débilmente) y en la raíz. Resulta conveniente hacer notar que no se observó la expresión del gen *gus* en órganos reproductivos ni en la vaina.

4.2.2.3.2.6 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtY14(mutS2-2)

En este caso, al mutar los elementos *site II* más cercanos al codón inicial, el patrón histoquímico observado fue el que se ilustra en la figura 48.

Como se puede observar, el patrón de tinción resulta muy diferente al descrito anteriormente, ya que en plántulas de hasta 20 días de desarrollo la expresión se detectó muy débilmente en el meristema apical del vástago y en las venas de los cotiledones. En plantas adultas sólo se observó tinción en los granos de polen.

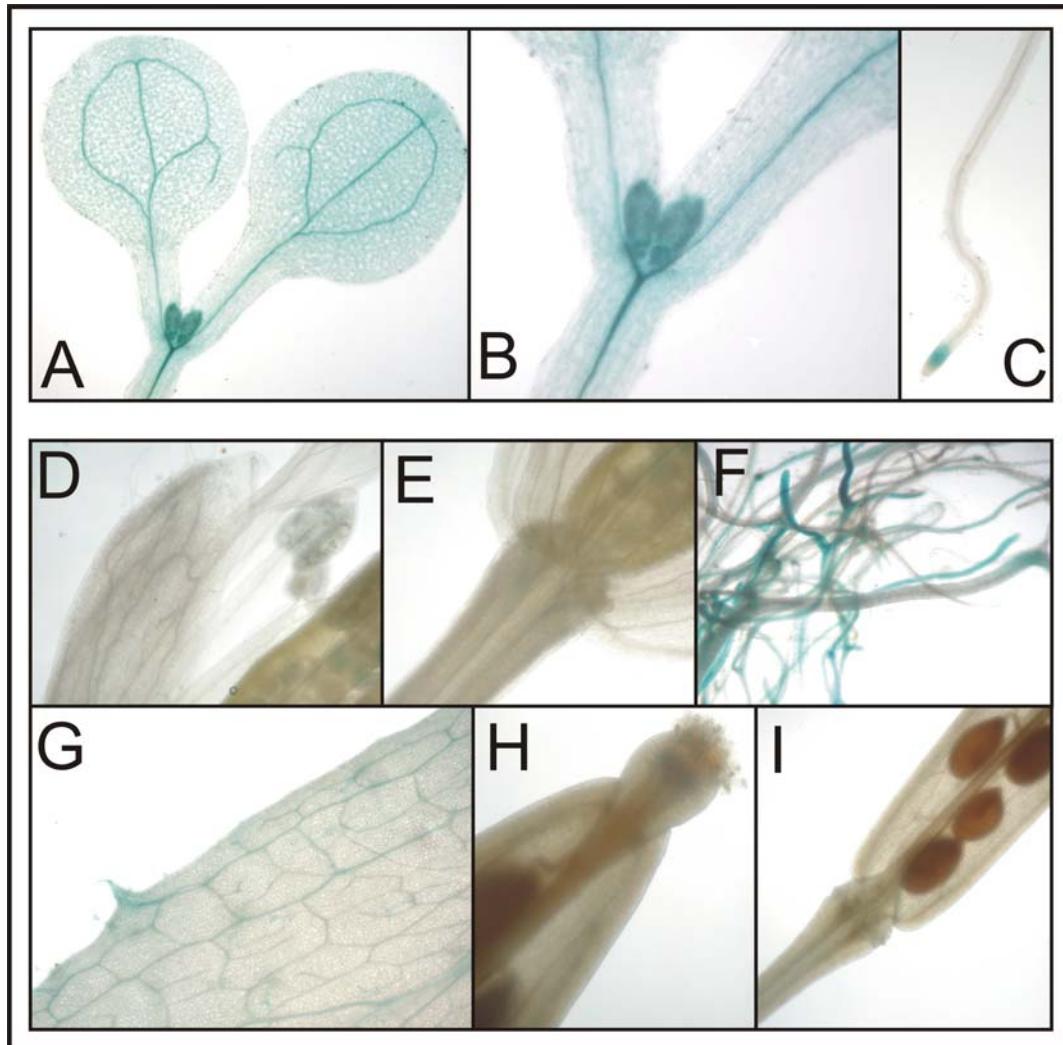


Figura 47: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtY14(mutS2-1). En plántulas de 20 días de desarrollo, A) y B) meristema apical del vástago y cotiledones; C) raíz. En plantas adultas, D) y E) anteras y receptáculo de la flor; F) raíz; G) hoja; H) e I) estigma y receptáculo de la vaina.

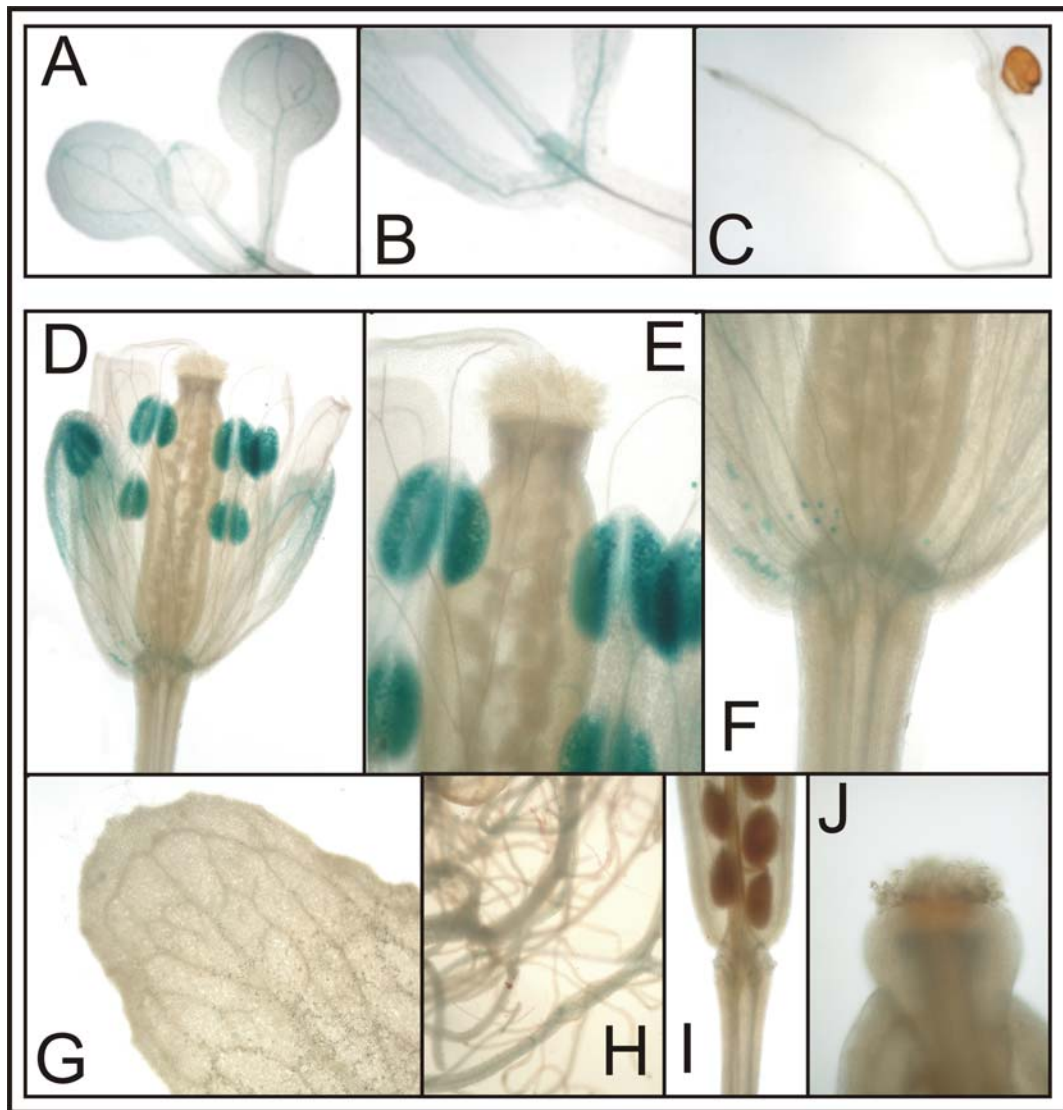


Figura 48: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtY14(mutS2-2). En plántulas de 20 días de desarrollo, A) y B) meristema apical del vástago, cotiledones y primera línea de hojas; C) raíz. En plantas adultas, D) y E) anteras; F) receptáculo de la flor; G) hoja; H) raíz; I) y J) receptáculo y estigma de la vaina.

4.2.2.3.2.7 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtY14(mutS2)

Cuando se analizaron las plantas que contenían la construcción pBI-AtY14(mutS2), es decir aquellas en las que los cuatro elementos *site II* se mutaron en forma puntual, el patrón de tinción obtenido fue el que se ilustra en la figura 49.

La ausencia de estos motivos en el promotor del gen *AtY14* condujo a una desaparición de la expresión del gen reportero, una situación similar a la mencionada previamente en el caso de *AtMAGO*.

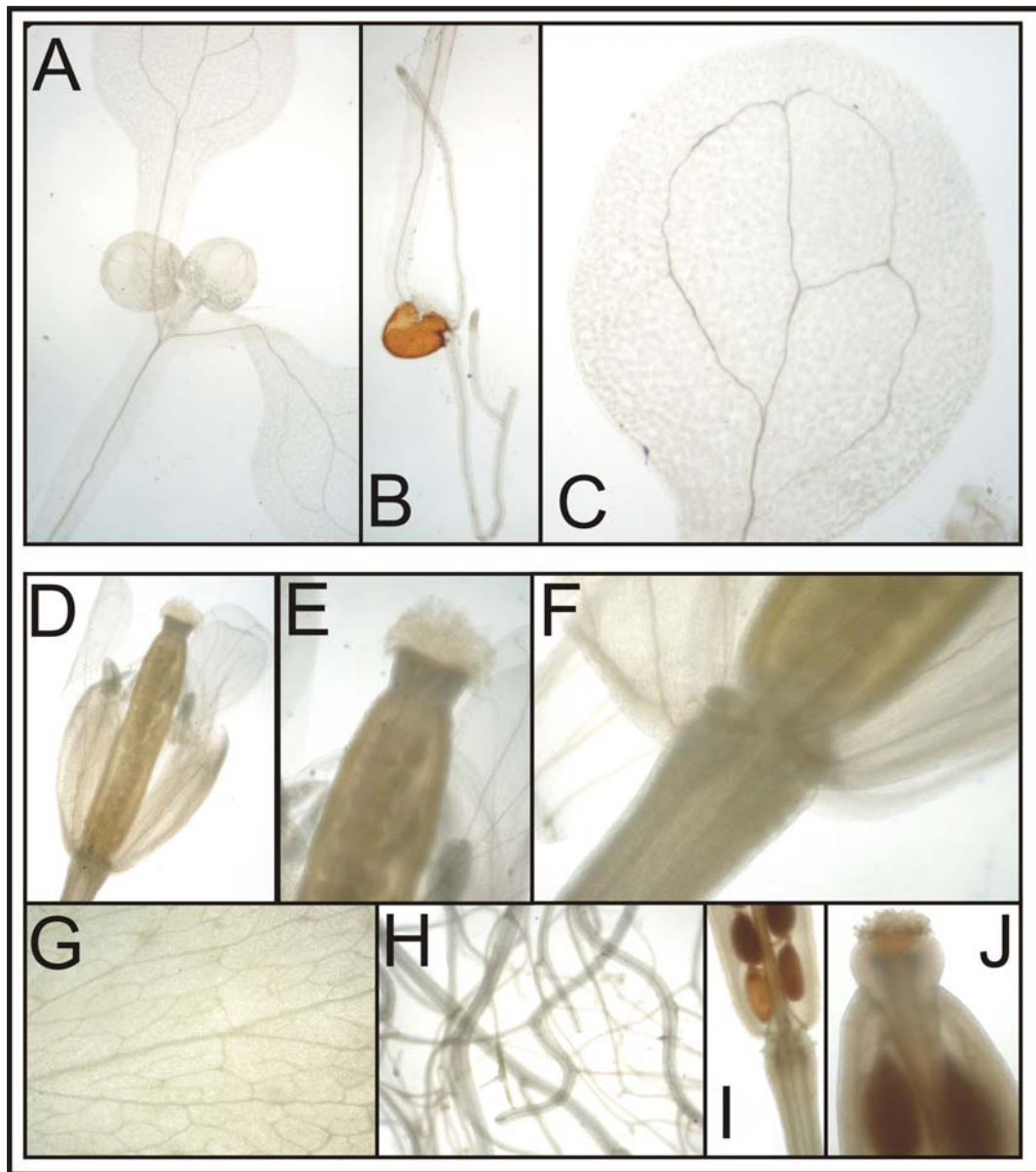


Figura 49: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtY14(mutS2-2). En plántulas de 20 días de desarrollo, A) meristema apical del vástago y primera línea de hojas; B) raíz; C) cotiledón. En plantas adultas, D) flor; E) y F) estigma y receptáculo de la flor; G) hoja; H) raíz; I) y J) receptáculo y estigma de la vaina.

4.2.2.3.2.8 Análisis histoquímico de plantas transformadas con la construcción pBI-AtPym(mutS2)

La región promotora del gen *AtPYM* contiene dos copias del elemento *site II* en su secuencia. La mutación puntual de ambos sitios condujo al patrón de expresión mostrado en la figura 50.

A diferencia de lo observado para los genes *AtMAGO* y *AtY14*, la ausencia de estos elementos no eliminó por completo la expresión del gen reportero en plántulas de hasta 20 días de desarrollo, detectándose tinción, aunque muy leve, en los meristemas apicales del vástago y de la raíz, como así también en las venas de los cotiledones.

En plantas adultas, no se observó tinción en ninguno de los órganos analizados, situación observada previamente con los otros dos genes.

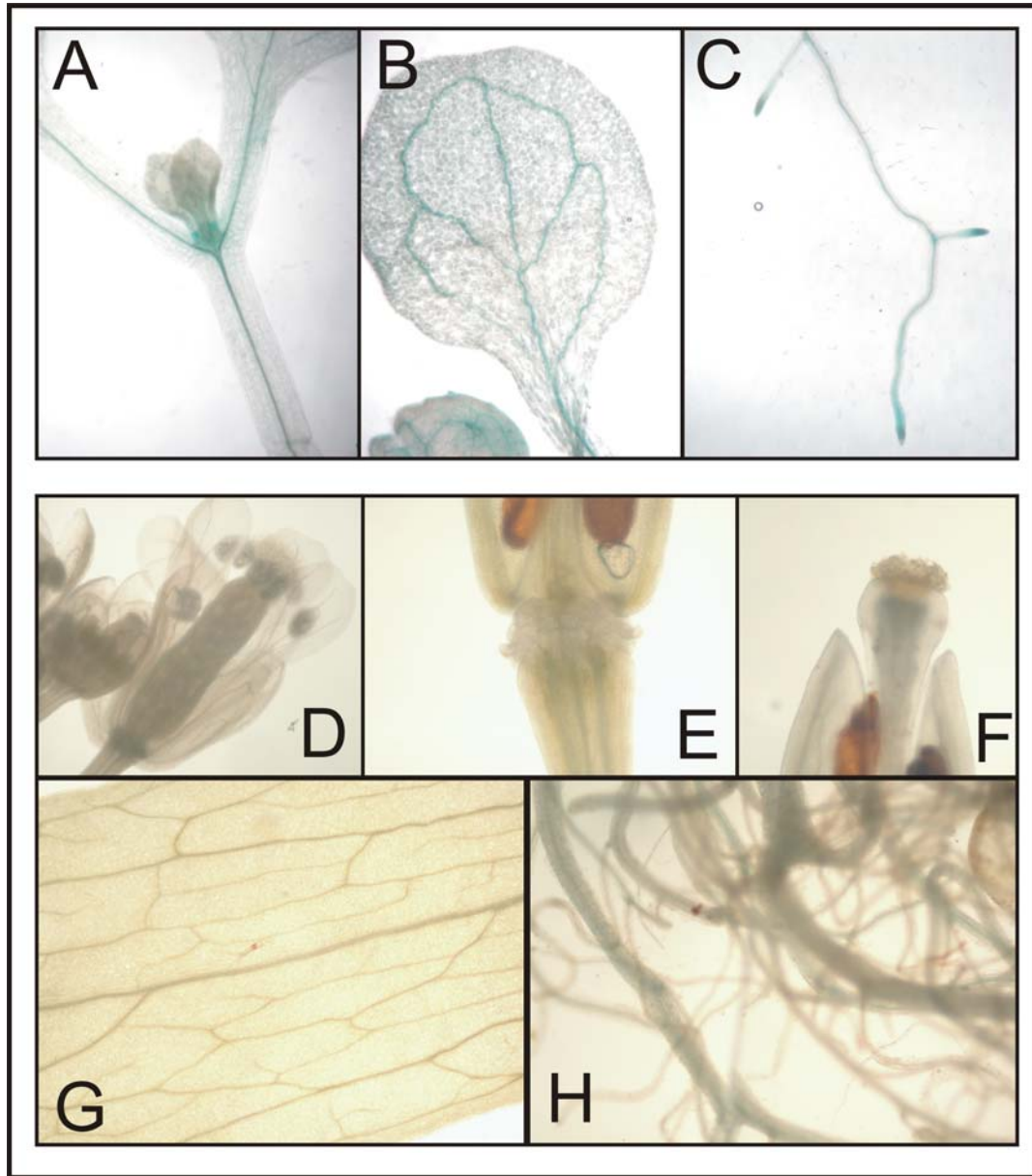


Figura 50: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtPym(mutS2). En plántulas de 12 días de desarrollo, A) meristema apical del vástago y primera línea de hojas; B) cotiledón; C) raíz. En plantas adultas, D) flor; E) y F) receptáculo y estigma de la vaina; G) hoja; H) raíz.

4.2.2.3.3 Análisis fluorométrico de actividad GUS en plántulas transgénicas

Con el fin de obtener una medida cuantitativa de la actividad GUS en las plantas transformadas con las distintas construcciones, se realizaron ensayos fluorométricos de actividad β -glucuronidasa utilizando extractos proteicos obtenidos a partir de tres líneas independientes de cada construcción siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.9.4.2 de Materiales y Métodos. Se realizaron ensayos por triplicado para cada muestra, de manera tal de poder realizar un análisis estadístico con los resultados obtenidos. Con los valores adquiridos se determinó la media (representada por la altura de cada barra) y el desvío estándar (barra de error) en cada caso. Asimismo, se analizaron los correspondientes testigos, es decir, plántulas transformadas con el vector pBI101.3 como control negativo y plántulas transformadas con el vector pBI121 como control positivo.

4.2.2.3.3.1 Análisis fluorométrico de actividad GUS en plántulas transformadas con las construcciones pBI-AtMago, pBI-AtMago(ACORT), pBI-AtMago(mutS2-2) y pBI-AtMago(mutS2)

Como puede observarse en la figura 52, los niveles de actividad enzimática GUS en las plantas transformadas con las construcciones pBI-AtMago resultaron unas 8 a 9 veces superiores con respecto a los del control negativo. Las plantas que contenían la versión acortada de este promotor mostraron valores apenas inferiores con respecto a aquellas transformadas con el promotor completo. Por otra parte, la mutación puntual de los dos elementos *site II* más cercanos al codón inicial condujo a una drástica disminución en los niveles de actividad GUS, alcanzando ésta valores comparables con los del control negativo. Esta situación también se observó en aquellas plantas que contenían el promotor de *AtMAGO* con sus tres elementos *site II* mutados.

Estos resultados se condicen con los obtenidos mediante el análisis histoquímico de estas plantas y refuerzan la importancia de estos motivos en la expresión del gen en estudio.

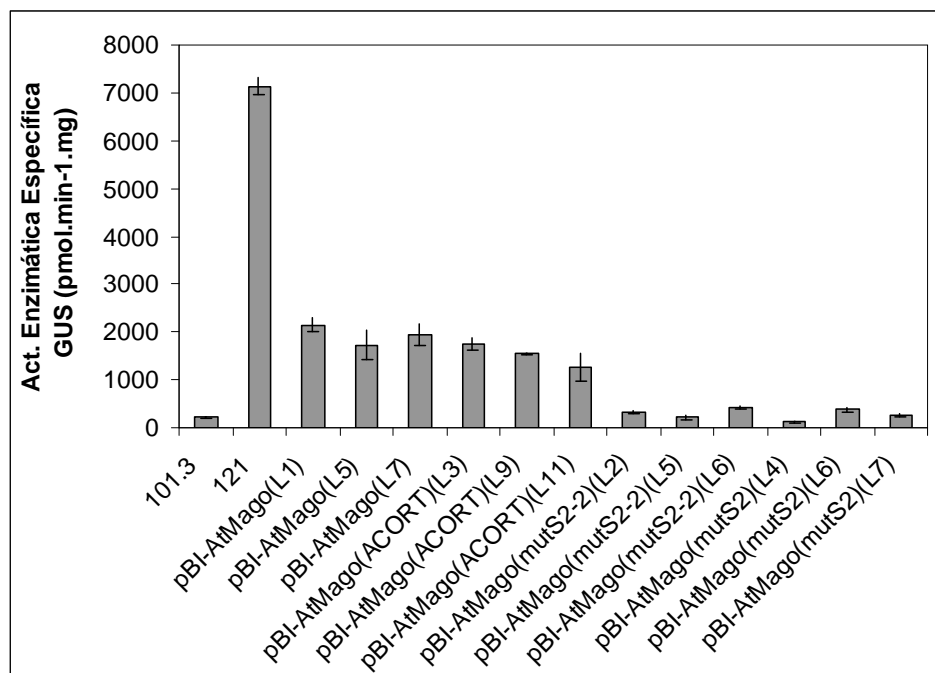


Figura 51: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas transgénicas de 15 días. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Los vectores indicados fueron los empleados para la transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*. 101.3 y 121 refieren a la actividad enzimática en plantas transformadas con los vectores pBI101.3 (control negativo) y pBI121 (control positivo), respectivamente. Se realizaron mediciones de tres reacciones para cada una de las tres líneas independientes analizadas por cada construcción.

4.2.2.3.3.2 Análisis fluorométrico de actividad GUS en plántulas transformadas con las construcciones pBI-AtY14, pBI-AtY14(ACORT), pBI-AtY14(mutS2-1), pBI-AtY14(mutS2-2) y pBI-AtY14(mutS2)

Las plantas que contenían la construcción pBI-AtY14 mostraron niveles de actividad GUS comparables con los de las plantas que contenían la región promotora de *AtMAGO*, algo que no resulta sorprendente si se tiene en cuenta que las proteínas que codifican ambos genes forman un heterodímero muy estable dentro de la célula y por lo tanto se deben expresar en forma coordinada (figura 53). A diferencia de lo observado anteriormente, las plantas transformadas con la versión acortada de la región promotora del gen *AtY14* alcanzaron niveles de actividad enzimática GUS similares a los del

promotor completo. Asimismo, al mutar puntualmente los motivos *site II* más alejados del codón inicial, se observó una disminución notable de los niveles de actividad GUS, que resultó aún mayor en aquellas plantas que no poseían los elementos *site II* más próximos a dicho codón. Finalmente, la ausencia de estos cuatro motivos condujo a valores de actividad comparables con los del control negativo, observándose nuevamente una correlación con los resultados histoquímicos.

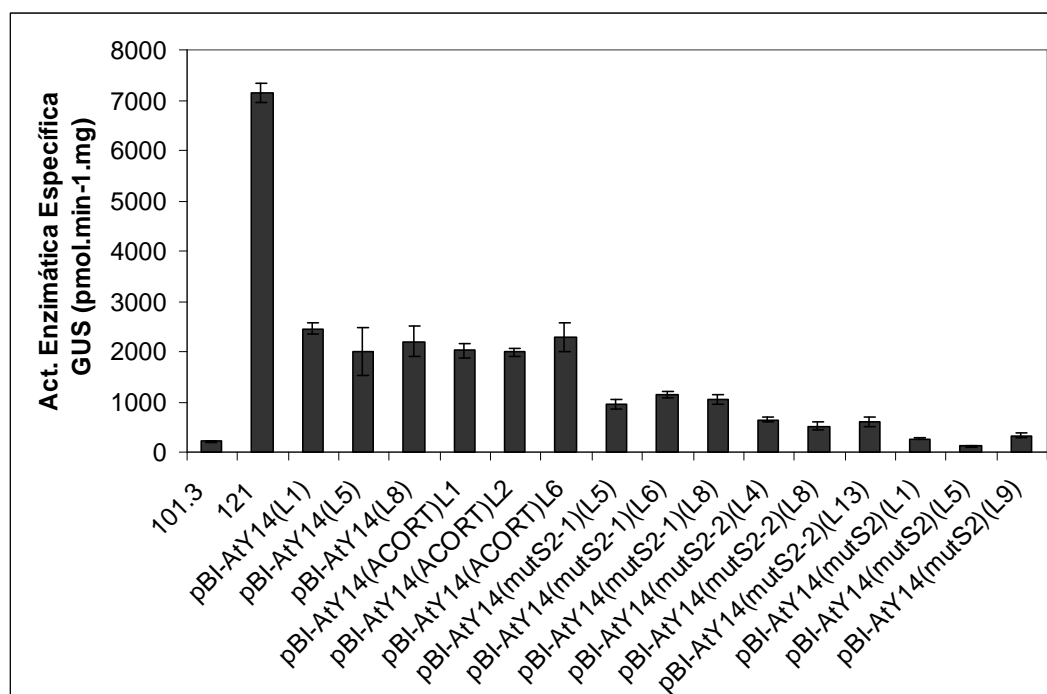


Figura 52: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas transgénicas de 15 días transformadas con las construcciones realizadas con el promotor del gen *AtY14*. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se realizaron mediciones de tres reacciones para cada una de las tres líneas independientes analizadas por cada construcción.

4.2.2.3.3 Análisis fluorométrico de actividad GUS en plántulas transformadas con las construcciones pBI-AtPym, pBI-AtPym(mutS2-1), pBI-AtPym(mutS2-2) y pBI-AtPym(mutS2)

Cuando se evaluaron los niveles de actividad enzimática GUS en aquellas plantas que contenían las distintas construcciones de la región promotora del gen *AtPYM* se obtuvieron los resultados que se ilustran en la figura 53. Como se puede observar en esta figura, las plantas transformadas con la construcción pBI-AtPym alcanzaron niveles de actividad GUS superiores a los de las plantas que contenían los vectores pBI-AtMago y pBI-AtY14, situación que se manifestó previamente en el patrón de tinción histológico de estas plantas. Al mutar en forma puntual e individual los dos elementos *site II* en este promotor, se pudo observar una disminución en los valores de GUS, que resultaron similares en ambos casos. Finalmente, las plántulas que contenían la construcción pBI-AtPym(mutS2) mostraron niveles de actividad apenas superiores a los del control negativo, justificando de esta manera la leve tinción observada en el análisis histoquímico de estas plantas.

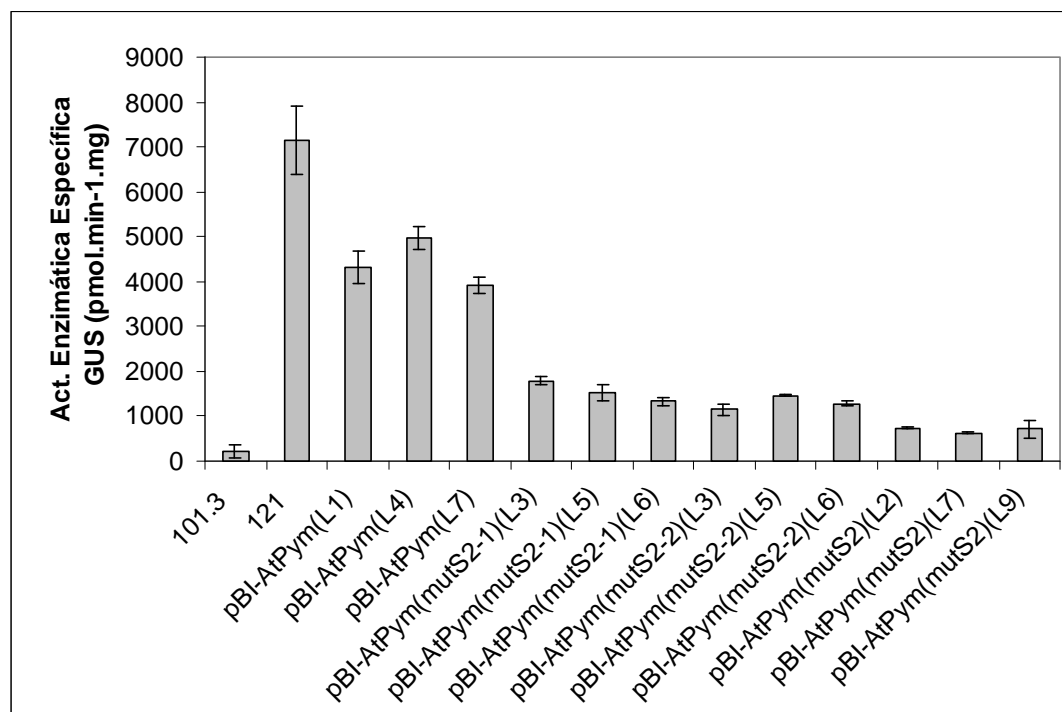


Figura 53: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas transgénicas de 15 días transformadas con las construcciones realizadas con el promotor del gen *AtPYM*. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se realizaron mediciones de tres reacciones para cada una de las tres líneas independientes analizadas por cada construcción.

4.2.2.3.3.4 Análisis fluorométrico de actividad GUS en distintos órganos de plantas transformadas

Para la realización de este estudio se utilizaron órganos obtenidos de plantas transgénicas adultas de 40 días que contenían las construcciones analizadas en el apartado anterior, empleando tres líneas independientes de cada una y realizando las reacciones por triplicado. Con los valores obtenidos se determinó la media (altura de las barras) y el desvío estándar (barras de error) en cada caso.

En el caso de las plantas transformadas con las construcciones pBI-AtMago y pBI-AtMago(ACORT), los niveles de actividad enzimática GUS alcanzada en todos los órganos analizados resultaron similares entre ambas clases de plantas transgénicas, resultado que se corresponde con los obtenidos mediante el estudio histoquímico. Por otra parte, al mutar los elementos *site II*, ya sea aquellos ubicados más cerca del codón inicial o los tres que contiene este promotor, la actividad enzimática cayó notoriamente y de igual manera en ambos casos (figura 54).

Cuando se realizó este análisis con las plantas que contenían las construcciones correspondientes al promotor del gen *AtY14*, los resultados obtenidos fueron los que se representan en la figura 55. De igual manera que con el promotor de *AtMAGO*, las plantas que contenían las construcciones pBI-AtY14 y pBI-AtY14(ACORT) mostraron valores de actividad GUS similares en todos los órganos relevados, lo que sugeriría que los elementos transcripcionales necesarios para la expresión tejido-específica se encontrarían dentro de la versión más corta del promotor. Asimismo, el efecto de la mutación de a pares de los elementos *site II* sobre la expresión del gen reportero en los distintos órganos también se puso de manifiesto en este análisis cuantitativo. Finalmente, la ausencia de los cuatro motivos condujo a niveles de GUS aún inferiores y similares en todos los órganos.

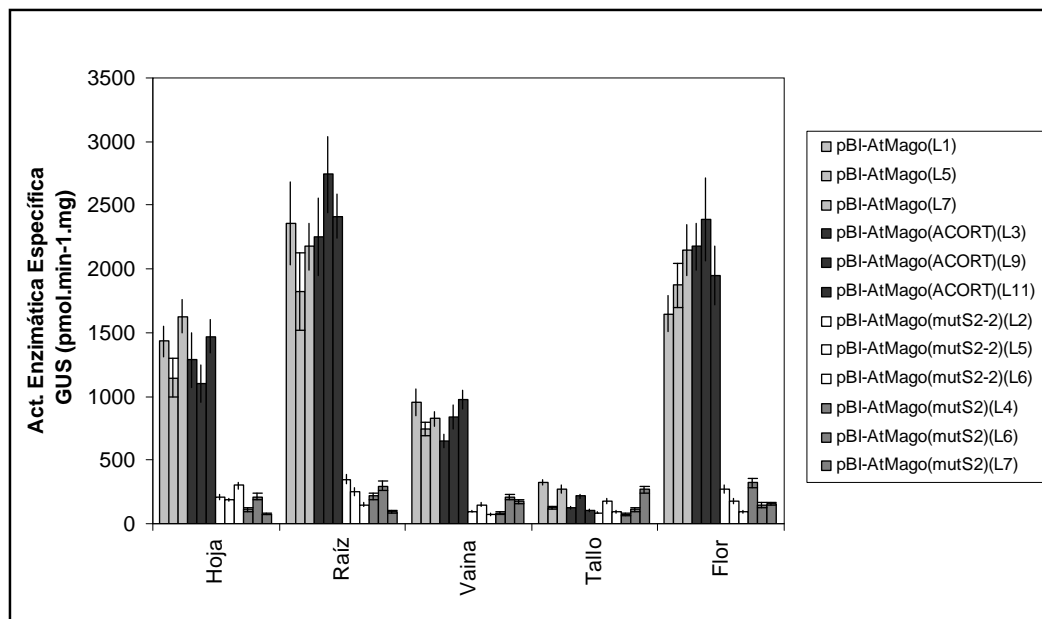


Figura 54: Niveles de actividad β -glucuronidasa en órganos de plantas transgénicas que contienen las construcciones indicadas a la derecha de la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron cinco órganos de cada una de las tres líneas de cada construcción, llevando a cabo las reacciones por triplicado.

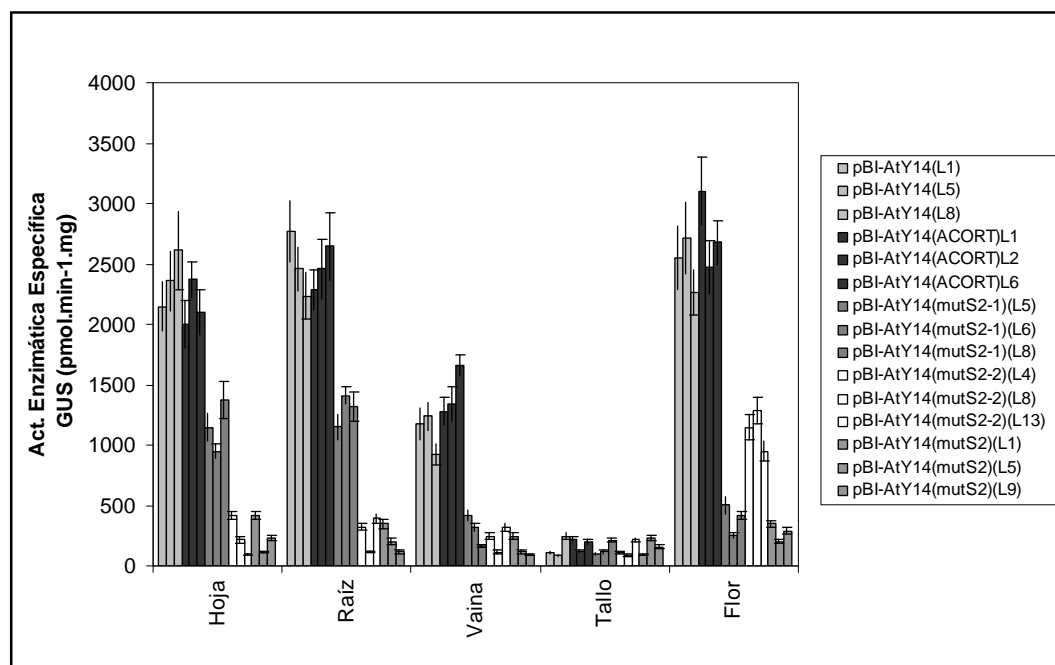


Figura 55: Niveles de actividad β -glucuronidasa en órganos de plantas transgénicas que contienen las construcciones correspondientes al promotor del gen *AtY14* indicadas a la derecha de la figura. La actividad enzimática GUS se

expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron cinco órganos de cada una de las tres líneas de cada construcción, llevando a cabo las reacciones por triplicado.

Un estudio similar se llevó a cabo con las plantas que contenían las construcciones pBI-AtPym, pBI-AtPym(mutS2-1), pBI-AtPym(mutS2-2) y pBI-AtPym(mutS2). En este caso, la mutación de uno u otro motivo *site II* condujo a una reducción similar de la actividad del gen reportero en todos los órganos analizados, reforzando la posibilidad de que ambos elementos operen en forma aditiva en la expresión del gen *AtPYM*. Asimismo, la ausencia de los dos elementos produjo una severa caída en los niveles de actividad en todos los órganos de la planta.

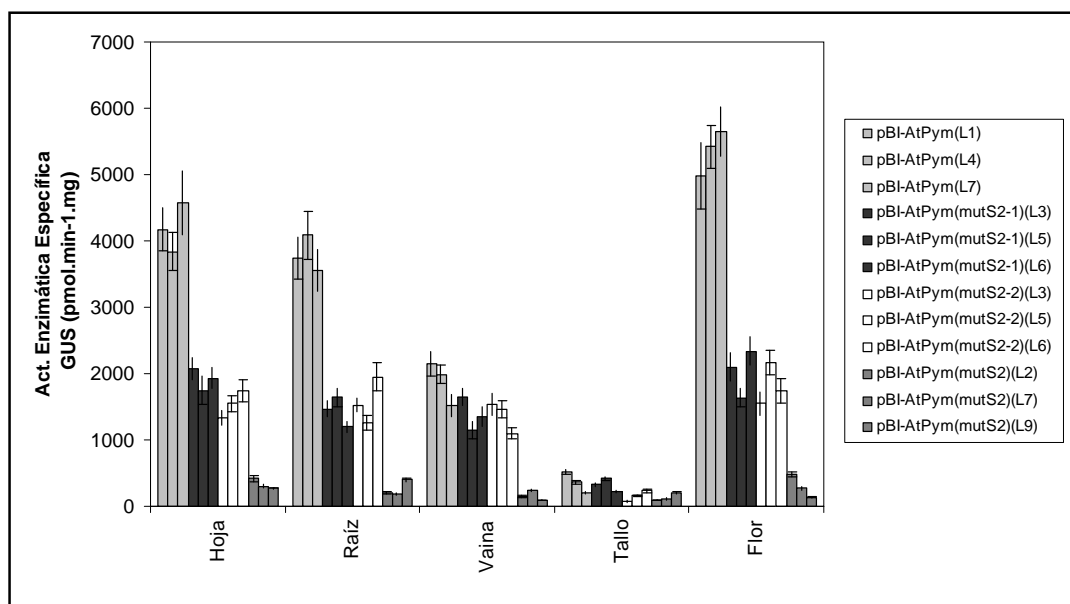


Figura 56: Niveles de actividad β -glucuronidasa en órganos de plantas transgénicas que contienen las construcciones indicadas a la derecha de la figura. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron cinco órganos de cada una de las tres líneas de cada construcción, llevando a cabo las reacciones por triplicado.

4.2.2.4 Análisis de la interacción *in vitro* entre los fragmentos de las regiones promotoras de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM* y proteínas nucleares - Ensayos de movilidad electroforética en geles de retardo (Band shift):

Una vez determinada la función de los elementos *site II* en la expresión de los genes en estudio, nos interesó dilucidar si los mismos eran capaces de unir factores de transcripción provenientes de un extracto de proteínas nucleares de inflorescencias de coliflor.

Siguiendo una estrategia similar a la descrita en el capítulo anterior y la metodología detallada en los apartados 2.2.7.9 y 2.2.7.10 de Materiales y Métodos, se realizó la marcación radioactiva y purificación de los fragmentos de cada uno de los promotores analizados:

- Fragmento del promotor de *AtMAGO* comprendido entre los nucleótidos -158 y -23 con respecto al codón inicial.
- Fragmento del promotor de *AtY14* comprendido entre los nucleótidos -211 y -27 con respecto al codón inicial.
- Fragmento del promotor de *AtPYM* comprendido entre los nucleótidos -1200 y -1112 con respecto al codón inicial.

Luego, mediante la estrategia descrita en el apartado 2.2.8.7.1, se realizó el ensayo de movilidad electroforética en geles de retardo obteniéndose los resultados ilustrados en la figura 57.

Como puede observarse en esta figura, existe una interacción entre el fragmento del promotor del gen *AtMAGO* (figura 57A) y proteínas del extracto nuclear de coliflor (calle 2), evidenciada por la presencia de dos bandas de retardo. Asimismo, al realizar un ensayo de competencia entre este oligonucleótido y el mismo fragmento sin marcar, en un exceso molar de 50 veces, se pudo observar que la unión detectada previamente desaparece, reflejando así una interacción específica entre el fragmento de ADN ensayado y las proteínas del extracto. Este mismo análisis, llevado a cabo con el mismo fragmento con sus motivos *site II* mutados (calles 5, 6, 7 y 8), reveló una ausencia de

bandas de retardo, lo que sugeriría que la señal observada en la calle 2 corresponde a proteínas unidas a estos motivos específicamente.

Un análisis similar se llevó a cabo con los fragmentos de los promotores de los genes *AtY14* y *AtPYM*, obteniéndose resultados análogos a los descritos anteriormente (figura 57 B y C, respectivamente), lo que refuerza la importancia de los elementos *site II* en estos promotores.

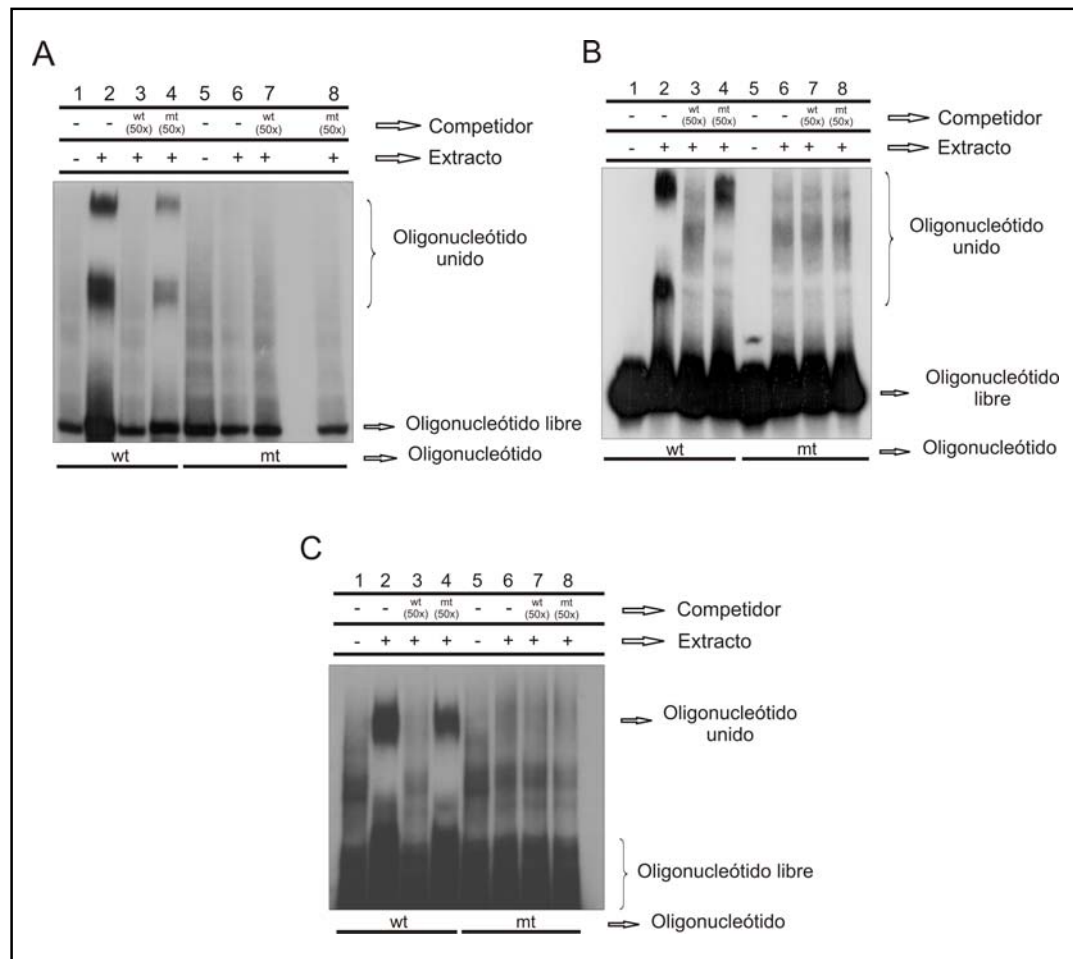


Figura 57: Ensayos de electroforesis en gels de retardo (Band shift) con los fragmentos de los promotores de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM* y extractos de proteínas nucleares de inflorescencias de coliflor. (A) Ensayo de Band shift con fragmentos de *AtMAGO*. Referencias: Calle 1, fragmento libre que contiene los motivos *site II*; Calle 2, el mismo fragmento incubado con 4 µg de proteínas de extractos nucleares; Calle 3, el mismo fragmento competido con un exceso molar de 50 veces de sí mismo. Calle 4, ensayo de competencia entre el fragmento con los elementos *site II* y similar fragmento de ADN carente de estos motivos (sin marcar), en un exceso de 50 veces. Calles

5 a 8, el mismo análisis pero realizado con el fragmento con sus elementos *site II* mutados. En (B) y (C) se llevó a cabo un análisis idéntico al descrito, pero con los fragmentos de los promotores de los genes *AtY14* y *AtPYM*, respectivamente.

4.2.2.5 Análisis del papel del intrón ubicado en la región 5'UTR y del primer exón del gen *AtPYM* en la regulación de su expresión génica

En el apartado 3.2.1 se hizo referencia a la presencia de una secuencia intrónica ubicada en la región 5'UTR del gen *AtPYM*. Por lo tanto, nos interesó determinar si este intrón era capaz de llevar a cabo alguna función en la expresión de dicho gen.

Por otra parte, se ha determinado en mamíferos y en *Xenopus laevis* que el EJC se une al ARN mensajero en una posición bastante conservada pero independiente de la secuencia, unos 20-25 nucleótidos corriente arriba de la unión exón-exón (Le Hir y col., 2000). Por tal motivo, nos planteamos estudiar el efecto que se produciría sobre la expresión al delecionar una porción del primer exón del gen *AtPYM*.

4.2.2.5.1 Deleción del intrón líder y del primer exón en el gen *AtPYM*

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.2.1.1.1 de Materiales y Métodos y empleando los oligonucleótidos específicos pPymDelIF, pPymDelIR, PpymDelE1AF y PpymDelE1AR, se procedió a delecionar en el gen en estudio el intrón, por un lado, y la mayor parte del primer exón, por el otro. Cabe destacar que en el segundo caso el diseño de los oligonucleótidos se realizó de manera tal de producir el mayor acortamiento posible de esta secuencia pero manteniendo los nucleótidos necesarios para que el proceso de *splicing* se lleve a cabo. De esta manera, los fragmentos obtenidos se ligaron al vector pBI101.3 y las construcciones fueron denominadas pBI-AtPym(-I) y pBI-AtPym(-E1), las que se emplearon para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (cepa CV2260) y plantas de *Arabidopsis thaliana*.

4.2.2.5.1.1 Análisis histoquímico de las plantas transformadas con las construcciones pBI-AtPym(-I) y pBI-AtPym(-E1)

Una vez seleccionadas con el antibiótico kanamicina e identificadas por PCR las plantas que contenían las construcciones de interés, se realizó con las mismas un análisis histoquímico de manera tal de poder evaluar el patrón de tinción conferido por el transgén en cada caso.

En la figura 58, se pueden observar los resultados obtenidos en este análisis con aquellas plantas que contenían la construcción pBI-AtPym(-I). Tanto en plántulas de hasta 20 días de desarrollo como en todos los órganos analizados en plantas adultas, no se pudo detectar actividad enzimática debida a la expresión del gen *gus*. Las plantas transformadas con la construcción pBI-AtPym(-E1) presentaron el mismo comportamiento (resultados no mostrados).

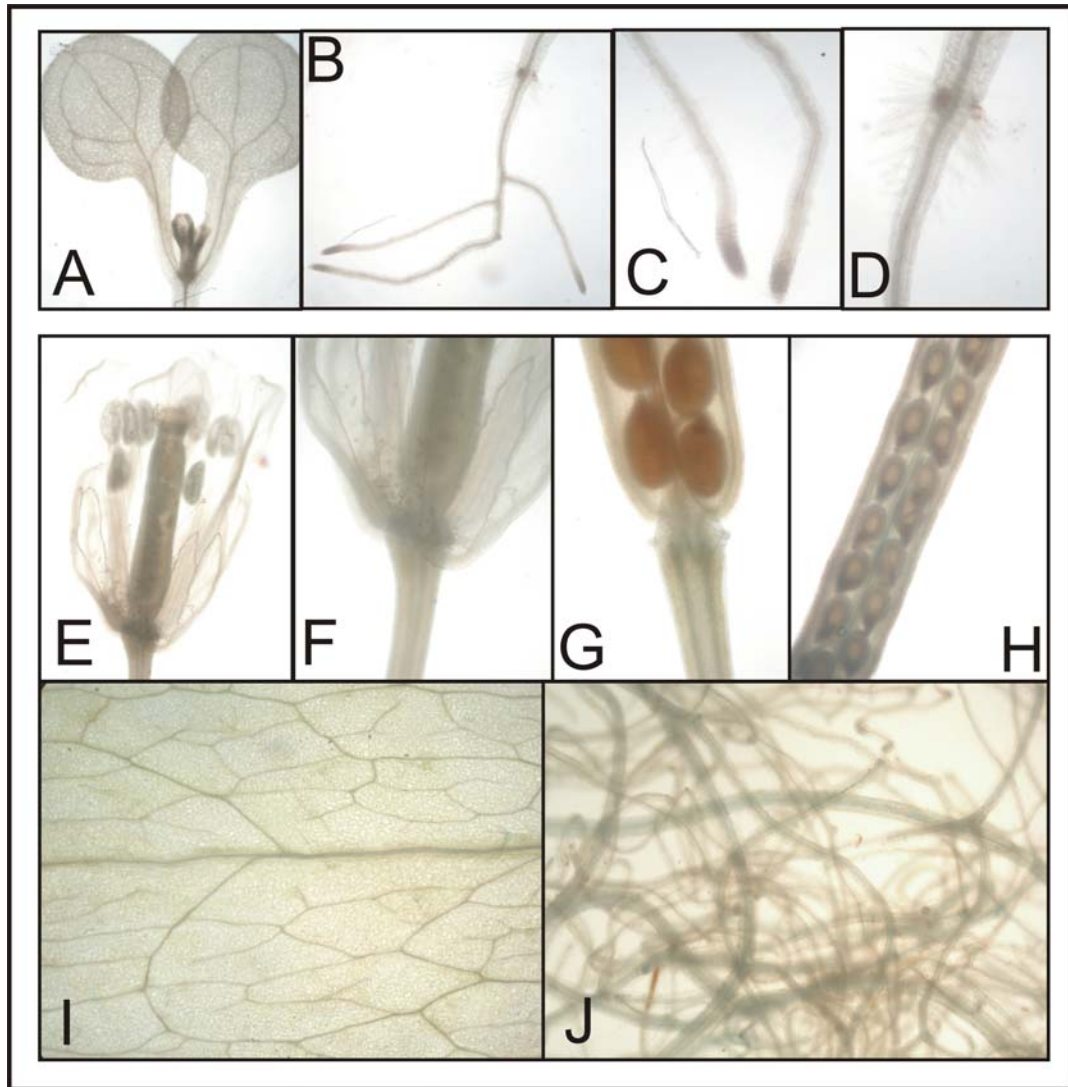


Figura 58: Detección histoquímica de actividad β -glucuronidasa en plántulas y órganos de plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con la construcción pBI-AtPym(-I). En plántulas de 12 días de desarrollo, A) meristema apical del vástago, cotiledones y primera línea de hojas; B), C) y D) raíz. En plantas adultas, E) flor; F) receptáculo de la flor; G) y H) vaina; I) hoja; J) raíz. El mismo resultado se obtuvo con las plantas transformadas con la construcción pBI-AtPym(-E1).

4.2.2.5.2 Análisis del efecto de los elementos *site II*, del intrón líder y del primer exón del gen *AtPYM* sobre la expresión a nivel de ARNm

Una vez determinada la importancia de los elementos *site II*, del intrón líder y del primer exón en la regulación de la expresión génica de *AtPYM*, puesta de manifiesto a través de las fusiones al gen reportero *gus*, nos preguntamos en qué pasos de la misma se estarían ejerciendo los roles de estas secuencias.

Para contestar este interrogante realizamos, en primer lugar, ensayos de Northern blot siguiendo la estrategia planteada en el apartado 2.2.7.5 de Materiales y Métodos. De esta manera intentamos evaluar los niveles de transcripto del gen *gus* en aquellas plantas que contenían las construcciones pBI-AtPym, pBI-AtPym(mutS2), pBI-AtPym(-I) y pBI-AtPym(-E1), para lo que se emplearon plántulas de 15 días de desarrollo, de dos o tres líneas independientes para cada construcción. Asimismo, se incluyeron en este análisis plantas transformadas con el vector pBI121 como control, ya que se sabe que en este caso la expresión del gen *gus* es regulada por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) principalmente a nivel transcripcional. Los resultados obtenidos de este análisis de ilustran en la figura 59.

Como se puede observar, los niveles de transcripto del gen *gus* en el caso de las plántulas que contenían la construcción pBI121 fueron notoriamente superiores con respecto a los de las plántulas transformadas con la construcción pBI-AtPym (figura 59A). Por otra parte, no pudimos detectar la presencia de dicho transcripto en las plantas transformadas con las construcciones pBI-AtPym(mutS2), pBI-AtPym(-I) y pBI-AtPym(-E1).

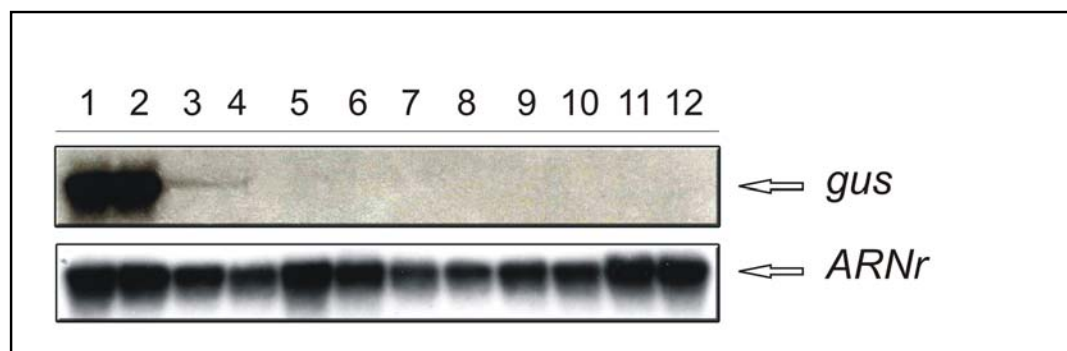


Figura 59: Análisis de los niveles de transcritos (Northern blot) en plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con las distintas fusiones al gen reportero *gus*. Se procesaron diferentes líneas de plantas transformadas con las distintas construcciones. Referencias: 1 y 2, pBI121; 3 y 4, pBI-AtPym; 5, 6 y 7, pBI-AtPym(-I); 8, 9 y 10, pBI-AtPym(-E1); 11 y 12, pBI-AtPym(-S2). Para analizar los niveles de ARN transferido, los filtros fueron hibridizados además con una sonda de ARNr 25S de *Vicia faba* (imagen inferior en la figura).

Para poder obtener una información cuantitativa de estos resultados, realizamos una “integración” de las señales observadas en las cuatro primeras calles del gel utilizando el programa informático ImageQuantTMTL Software (GE Healthcare). De esta manera, se calculó que el promedio de los niveles de transcritos *gus* en las plantas que contenían la construcción pBI-AtPym era aproximadamente del 10% con respecto al de las plantas transformadas con el vector pBI121.

El segundo paso consistió en determinar los niveles de actividad GUS en las plántulas empleadas en el ensayo anterior. Dado que la proteína expresada es idéntica en todos los casos, asumimos que la actividad específica obtenida refleja la cantidad de proteína presente en los extractos. Los resultados alcanzados se representaron gráficamente en la figura 60.

Los niveles de actividad enzimática específica GUS en las plántulas que contenían la construcción pBI121 resultaron sólo dos veces superiores a los de las plántulas pBI-AtPym.

Si bien las plántulas pBI-AtPym(mutS2) exhibieron valores de actividad GUS muy por debajo (un 10% aproximadamente) de las que contenían la construcción pBI-

AtPym, esta actividad resultó casi tres veces superior a las de plántulas que contenían la delección del intrón o del primer exón.

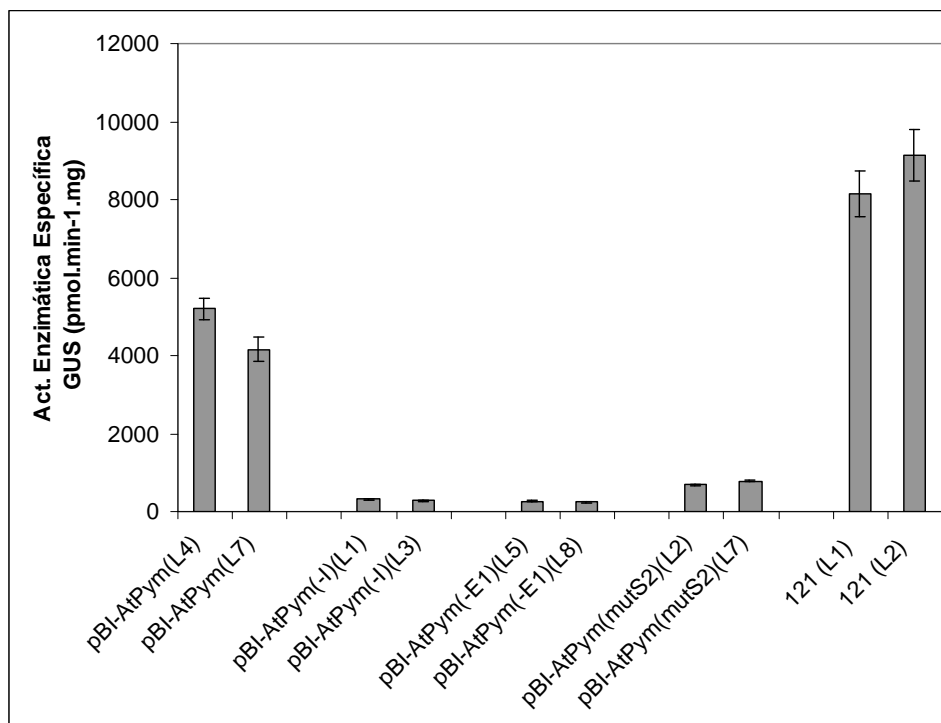


Figura 60: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas transgénicas que contienen las distintas construcciones realizadas con el gen *AtPYM* fusionadas al reportero *gus*. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹. Se analizaron plántulas de dos líneas de cada construcción, llevando a cabo las reacciones por triplicado.

4.2.2.6 Enriquecimiento de los motivos *site II* en las regiones promotoras de los genes constituyentes del EJC

Una vez determinada la importancia de los elementos *site II* en las regiones promotoras en estudio y del intrón líder en el gen *AtPYM*, decidimos examinar las secuencias ubicadas corriente arriba del codón inicial en otros genes de componentes del EJC. Empleando bases de datos de acceso público (<http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y <http://arabidopsis.org/>) obtuvimos las regiones promotoras y 5'UTR de 12 genes reportados como constituyentes del complejo

en *Arabidopsis thaliana* (además de los estudiados en este trabajo). Asimismo, se tuvo en cuenta en este análisis un algoritmo capaz de asignar una “puntuación” (IMEter score) a los intrones analizados (Rose y col., 2008). Este “score” contempla características tales como tamaño y presencia de ciertos elementos relevantes en dichas secuencias. Cuando el “IMEter score” adquiere un valor positivo el algoritmo predice que ese intrón probablemente ejerce un efecto activador de la expresión génica. Los resultados obtenidos a partir de este análisis se resumieron en la tabla N° 6.

Como se puede observar, al menos uno de los genes codificantes para cada una de las proteínas del EJC contiene como mínimo una copia del elemento *site II* en su promotor. La única excepción es el gen *AtMLN51*, que no contiene *site II* en su secuencia promotora, aunque sí posee un intrón líder con un “IMEter score” positivo.

Proteína	N° At	Intrón en la 5'UTR (IMEter score)	N° <i>site II</i>
Mago	At1g02140	No	3
Y14	At1g51510	No	4
Pym	At1g11400	Si (10.499)	2
eIF4A-III	At1g51380	No	0
	At3g19760	No	2
Pinin	At1g15200	No	1
MLN51	At1g80000	Si (8.784)	0
Aly/Ref	At5g59950	No	0
	At1g66260	No	2
	At5g37720	No	0
	At1g66260	No	0
P15	At1g11570	No	0
	At1g27970	No	0
	At1g27310	No	2
DEK	At3g48710	No	0
	At5g63550	No	2
	At4g26630	No	0
	At5g55660	Si (73.248)	1
SRm160	At2g29210	No	1
RNPS1	At1g16610	No	5
Upf2	At2g39260	No	1
Upf3	At1g33980	No	4
UAP56	At5g11200	Si (6.239)	3
	At5g11170	Si (8.817)	1
SAP18	AT2G45640	No	3

Tabla N° 6: Presencia de motivos *site II* e intrones líderes en genes de componentes del EJC de *Arabidopsis thaliana*. Mediante bases de datos de acceso público se examinaron las secuencias promotoras de estos genes y sus regiones 5'UTR, asignándoles un "score", en caso de contener un intrón líder, que predice su posible función en la expresión del gen que lo posee.

4.2.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS ATMAGO, ATY14 Y ATPYM EN ARABIDOPSIS THALIANA

4.2.3.1 Obtención de plantas que sobreexpresan las proteínas en estudio

Para evaluar en más detalle las relaciones funcionales entre las proteínas del EJC en estudio, se obtuvieron plantas transformadas con construcciones que permitían la sobreexpresión de cada una de ellas. En cada caso, las plantas contenían la fusión de cada ADNc al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV) según la estrategia planteada en el apartado 2.2.1.2 de Materiales y Métodos. Además, se obtuvieron anticuerpos específicos contra las proteínas expresadas en forma recombinante en *E. coli*.

Con extractos obtenidos de las diferentes líneas (ver 2.2.8.1.1), se realizaron ensayos de Western blot en condiciones desnaturalizantes siguiendo la metodología descrita en el punto 2.2.8.4. Los resultados alcanzados se ilustran en la figura 61. En esta imagen se puede observar que las proteínas de interés fueron fácilmente detectables en los extractos de plantas wt y que el sistema de sobreexpresión utilizado permitió alcanzar niveles de cada una de ellas superiores a los de las plantas no transformadas.

Por otra parte, no se observaron aumentos en los niveles de AtMago (figura 61A) ni AtY14 (figura 61B) en ninguno de los extractos que sobreexpresan las otras proteínas. En cambio, sí se registró un incremento de AtPym con respecto a las plantas wt en aquellas plantas que sobreexpresan AtMago y AtY14 (figura 61C).

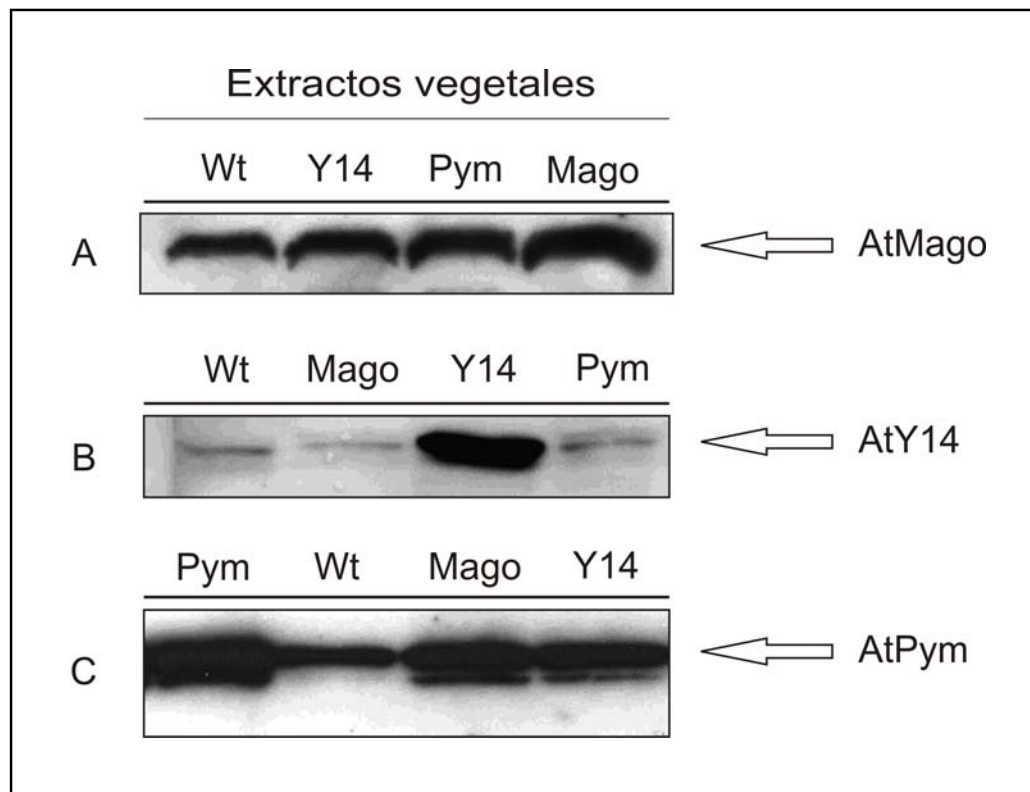


Figura 61: Ensayo de Western blot en condiciones desnaturalizantes. Se emplearon plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con los sistemas de sobreexpresión de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM*. En (A) se realizó la inmunodetección de la proteína AtMago en los extractos de plantas referenciados en la zona superior de la imagen. En forma análoga, se procedió a la identificación de las proteínas AtY14 y AtPym, ilustradas en las imágenes (B) y (C) respectivamente.

4.2.3.2 Ensayos de Western blot en condiciones no desnaturalizantes

Una vez determinada la eficacia de nuestro sistema de detección de las proteínas de interés, nos interesó evaluar en estos extractos proteicos la formación de complejos entre las mismas. Por este motivo, realizamos un análisis similar al descrito anteriormente en geles no desnaturalizantes. Siguiendo la metodología mencionada en el apartado 2.2.8.3, se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 62.

En todos los casos, se observaron dos bandas de idéntica movilidad electroforética, indicando que las tres proteínas probablemente forman parte de un mismo complejo proteico. La intensidad de las bandas, con los tres anticuerpos, fue

notoriamente mayor en los extractos de plantas que sobreexpresan AtPym que en los extractos de plantas wt y de aquellas que sobreexpresan las proteínas AtMago y AtY14.

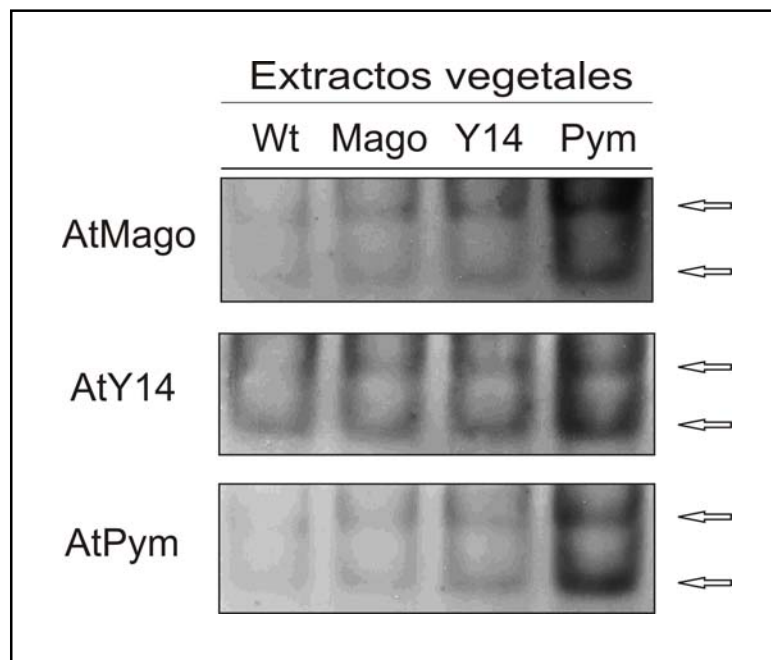


Figura 62: Ensayo de Western blot en condiciones no desnaturalizantes. Se emplearon plántulas de 15 días de desarrollo transformadas con los sistemas de sobreexpresión de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM*. Se realizó la inmunodetección de las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym en los extractos de plantas referenciados en la zona superior de la imagen. Con dos flechas se indican los complejos detectados con los tres anticuerpos empleados y que presentaron la misma movilidad electroforética.

4.2.3.3 Defosforilación de extractos proteicos y su efecto en la formación del complejo AtMago-AtY14-AtPym

El efecto de la fosforilación en la regulación de la actividad biológica de la proteína Y14 humana fue previamente reportado como una manera de modular su capacidad de interactuar con otros componentes del EJC (Hsu y col., 2005). Los autores encontraron que la proteína es fosforilada en su extremo C terminal, en particular en los residuos de serina de dos dipéptidos SR (arginina-serina).

Teniendo presente el hecho de que AtY14 forma parte del “core” del EJC y que los dipéptidos SR en el extremo C terminal de la proteína están conservados entre la proteína humana y la de *Arabidopsis* (figura 64B), nos planteamos el interrogante acerca de la influencia que esta modificación post-traducciona era capaz de ejercer sobre la formación del complejo.

Para poder contestar esta pregunta, realizamos un tratamiento de los extractos “wt” con la enzima Fosfatasa Alcalina de intestino de ternero, siguiendo la metodología del punto 2.2.8.6 de Materiales y Métodos. Posteriormente, se procedió a realizar el ensayo de Western blot en condiciones no desnaturizantes, en forma análoga a la comentada en el apartado anterior.

Los resultados obtenidos a través de esta experiencia se ilustran en la figura 63. Como consecuencia del tratamiento del extracto proteico con Fosfatasa Alcalina, se puede observar un aumento en los niveles de complejo, proporcionalmente mayor al incrementar la cantidad de enzima empleada en la reacción.

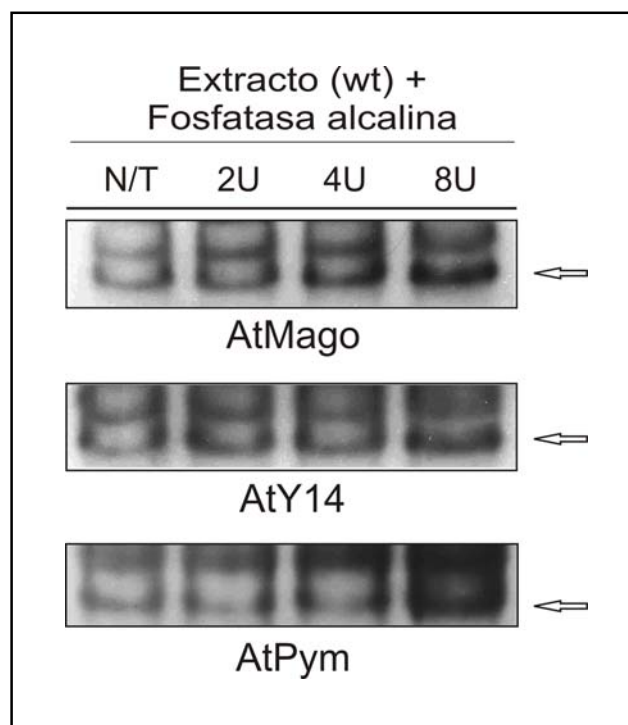


Figura 63: Ensayo de defosforilación de extractos proteicos con Fosfatasa Alcalina de intestino de ternero y Western blot en condiciones no desnaturalizantes. Se realizó la inmunodetección de las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym en extractos de plántulas de 15 días de desarrollo no transformadas, luego del tratamiento con la enzima. La flecha en cada imagen indica el complejo detectado con los tres anticuerpos y que presentó la misma movilidad electroforética.

4.2.3.4 Ensayo de fosforilación *in vitro* de las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym expresadas en forma recombinante

Los ensayos de defosforilación de extractos proteicos pusieron en evidencia el efecto de este tratamiento sobre la formación del complejo constituido por las proteínas en estudio. Sin embargo, esta experiencia no establecía qué proteínas eran susceptibles a tal modificación post-traducciona.

Por este motivo, el siguiente paso consistió en someter a una marcación radioactiva con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym. Sólo aquellas proteínas capaces de ser fosforiladas incorporarán ^{32}P , provenientes del ATP agregado al medio de reacción, que también incluía una purificación parcial de proteínas quinasas de endosperma de trigo.

En primer lugar, fue necesario expresar las proteínas en estudio en forma recombinante en bacterias (ver punto 2.2.8.7 de Materiales y Métodos). De esta manera, AtMago y AtY14 se expresaron fusionadas a la proteína GST, mientras que AtPym se fusionó al polipéptido MBP.

La reacción de fosforilación *in vitro* se llevó a cabo siguiendo la estrategia planteada en el apartado 2.2.8.5. También se sometieron a este ensayo el extracto de quinasas empleado (ya que podrían fosforilarse proteínas del extracto) y las proteínas GST y MBP, oficiando en todos los casos como controles. Los resultados obtenidos en esta experiencia se muestran en las figuras 64 y 65.

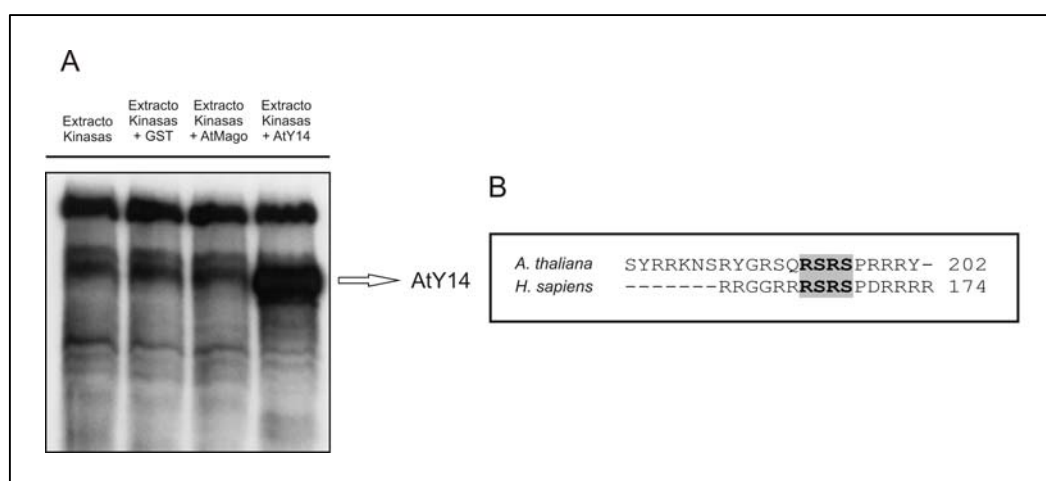


Figura 64: (A) Ensayo de fosforilación *in vitro* de las proteínas GST, GST-AtMago y GST-AtY14. Proteínas del extracto empleado fueron capaces de ser fosforiladas y produjeron el patrón de bandas observado en la primera calle. En la imagen se indica mediante una flecha la señal producida como consecuencia de la incorporación de ^{32}P en la fusión GST-AtY14 y que demuestra que la proteína AtY14 puede ser fosforilada *in vitro*. La ausencia de bandas adicionales en la tercera calle sugiere que AtMago no es fosforilada en las condiciones del ensayo. (B) Conservación de los dipéptidos SR en las proteínas Y14 de *H. sapiens* y *Arabidopsis*.

Como se puede observar en la figura 64, el patrón de bandas en las tres primeras calles resultó idéntico, lo que pone de manifiesto la incapacidad de las proteínas GST y GST-AtMago de ser fosforiladas en estas condiciones. Sin embargo, en la cuarta calle se detectó una banda adicional muy intensa que se corresponde en tamaño con la fusión

GST-AtY14, lo que sugiere que la proteína AtY14 puede ser fosforilada en estas condiciones.

En la figura 65, se señala una banda que se corresponde en tamaño con la fusión MBP-AtPym. Teniendo en cuenta que en este ensayo no se detectó ninguna banda que se corresponda a la proteína MBP, esto sugiere que AtPym también puede ser fosforilada.

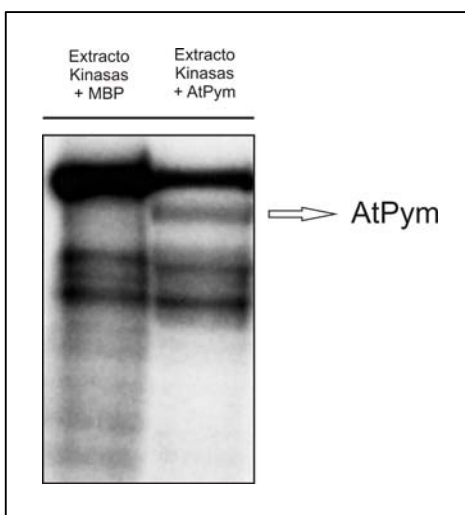


Figura 65: Ensayo de fosforilación *in vitro* de las proteínas MBP y MBP-AtPym. En la imagen se indica mediante una flecha la señal producida como consecuencia de la incorporación de ^{32}P en la fusión MBP-AtPym y que demuestra que la proteína AtPym puede ser fosforilada en estas condiciones. Cabe destacar que no se observó ninguna señal adicional cuando el ensayo se realizó con la proteína MBP.

4.2.3.5 Ensayo de defosforilación de las proteínas AtY14 y AtPym

Una vez demostrado que las versiones recombinantes de AtY14 y AtPym eran capaces de ser fosforiladas, intentamos determinar si estas proteínas una vez sintetizadas por la célula eran capaces de ser modificadas post-traduccionalmente.

Para lograrlo, se llevó a cabo la estrategia descrita en el apartado 2.2.8.6 de Materiales y Métodos, empleando extractos que sobreexpresaban las proteínas de interés.

Las proteínas, al ser fosforiladas, presentan una menor migración electroforética con respecto a la misma macromolécula sin fosforilar. De esta manera, en una corrida electroforética en un gel de poliacrilamida de concentración adecuada, es posible visualizar ambas especies si se cuenta con un anticuerpo capaz de detectarlas.

En el caso de la proteína AtPym los resultados obtenidos no resultaron concluyentes. Sin embargo, al realizar la experiencia con los extractos que sobreexpresaban la proteína AtY14 se obtuvo el resultado ilustrado en la figura 66.

Como se puede observar en esta imagen, se detectaron dos especies correspondientes a AtY14. Además, al incubar el extracto con la enzima Fosfatasa Alcalina de intestino de ternero (8U), la banda superior (probablemente correspondiente a la proteína fosforilada) disminuyó notoriamente su intensidad.

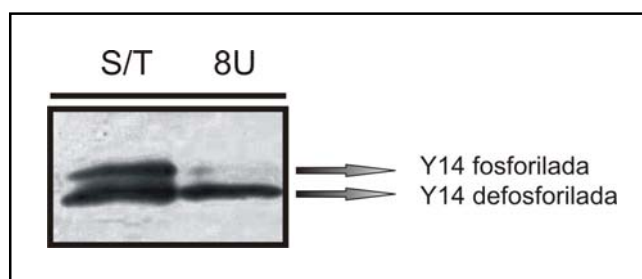


Figura 66: Ensayo de defosforilación de un extracto de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresa la proteína AtY14. Referencias: S/T: Sin Tratamiento; 8U: 8 Unidades de la enzima Fosfatasa Alcalina de intestino de ternero.

4.2.3.6 Ensayo de interacción proteína-proteína *in vitro* (pull-down)

En 2007, Park y colaboradores reportaron la interacción *in vitro* entre las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym. Asimismo, establecieron las regiones que AtPym comprometía en su interacción con las otras dos proteínas, tanto en forma individual como así también con el heterodímero.

La capacidad de las proteínas AtY14 y AtPym de ser fosforiladas *in vitro* planteó el interrogante acerca de si esta modificación produciría algún efecto sobre la

interacción entre estas proteínas. Por tal motivo, decidimos replicar los ensayos de pull-down realizados por Park y col. (2007) y evaluar además el efecto de la fosforilación de AtY14 y AtPym sobre la interacción entre ellas y con AtMago, siguiendo la estrategia descrita en el apartado 2.2.8.8 de Materiales y Métodos.

En el caso de la interacción entre las proteínas de fusión GST-AtMago y MBP-AtPym, la fosforilación de esta última no condujo a ningún cambio en la unión entre ambas (figura 67), resultado que se pone de manifiesto debido a que las señales en la segunda y tercera calle resultan muy similares entre sí. Como control del ensayo de fosforilación, se realizó una experiencia en la cual se omitió el agregado de ATP en la incubación de la proteína MBP-AtPym con el extracto de quinasas (en la figura corresponde a la última calle).

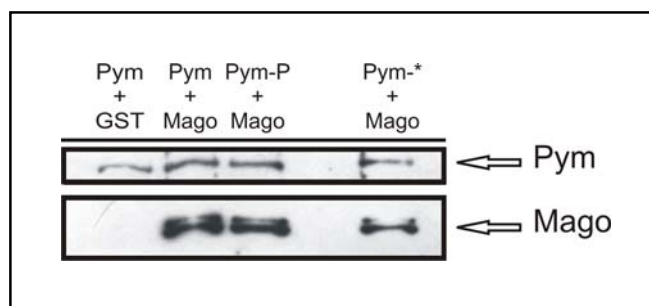


Figura 67: Ensayo de pull-down realizado con las versiones recombinantes de las proteínas AtMago y AtPym. En las regiones superior e inferior de la imagen se visualizan las detecciones de las proteínas MBP-AtPym y GST-AtMago, respectivamente. La ausencia de banda en la primera calle demuestra que no se produjo interacción entre las proteínas MBP-AtPym y GST (control negativo de la experiencia). En la tercera calle, la proteína AtPym fue incubada previamente con el extracto de quinasas (-P). Luego se adicionó AtY14 y finalmente se incubó la mezcla con la resina de amilosa. En la cuarta calle se realizó un ensayo similar al antes descrito pero omitiendo el agregado de ATP (-*).

Un ensayo similar se realizó con las proteínas AtPym y AtY14, obteniéndose los resultados mostrados en la figura 68.

En este caso, la fosforilación de MBP-AtPym produjo una notoria disminución en la interacción entre ésta y GST-AtY14 (comparación entre las señales en las calles 2 y 3). Por otra parte, la presencia de una banda en la calle 4 de intensidad similar a la de

la calle 2, descarta la posibilidad de que la disminución observada en la calle 3 se deba a algún efecto distinto al de la fosforilación de MBP-AtPym.

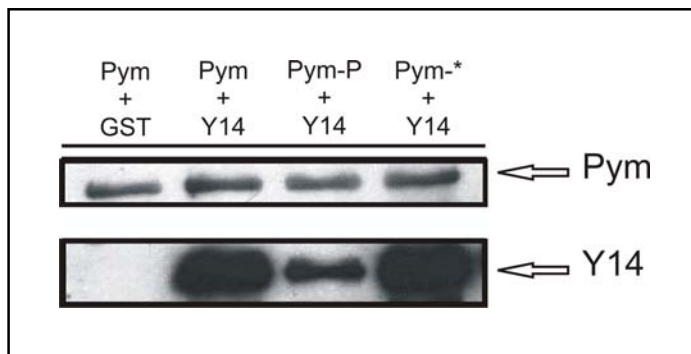


Figura 68: Ensayo de pull-down realizado con las versiones recombinantes de las proteínas AtPym y AtY14. En las regiones superior e inferior de la imagen se visualizan las detecciones de las proteínas MBP-AtPym y GST-AtY14, respectivamente. La ausencia de banda en la primera calle demuestra que no se produjo interacción entre las proteínas MBP-AtPym y GST (control negativo de la experiencia). En la tercera calle, la proteína AtPym fue incubada previamente con el extracto de quinasas (-P). Luego se adicionó AtY14 y finalmente se incubó la mezcla con la resina de amilosa. En la cuarta calle se realizó un ensayo similar al antes descrito pero omitiendo el agregado de ATP (-*).

El próximo paso consistió en evaluar el efecto de la fosforilación de GST-AtY14 sobre la interacción con MBP-AtPym. El resultado obtenido se muestra en la figura 69.

Al igual que con MBP-AtPym, la fosforilación de GST-AtY14 produjo un efecto negativo sobre la interacción entre estas proteínas, que se puso en evidencia a través de una disminución en la intensidad de la banda de la calle 4 con respecto a la de la calle 3. Estos ensayos fueron realizados por duplicado (calle 3 y 5, respectivamente).

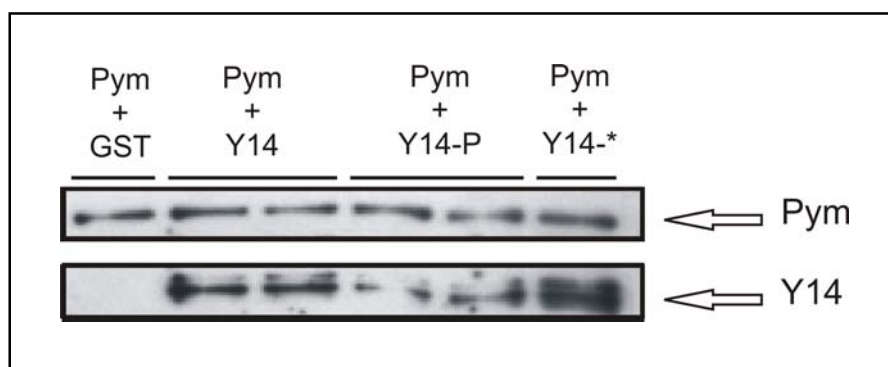


Figura 69: Ensayo de pull-down realizado con las versiones recombinantes de las proteínas AtPym y AtY14. En las regiones superior e inferior de la imagen se visualizan las detecciones de las proteínas MBP-AtPym y GST-AtY14, respectivamente. La ausencia de banda en la primera calle demuestra que no se produjo interacción entre las proteínas MBP-AtPym y GST (control negativo de la experiencia). En la cuarta y quinta calle, la proteína AtY14 fue incubada previamente con el extracto de quinasas (-P). Luego se adicionó AtPym y finalmente se incubó la mezcla con la resina de amilosa. En la sexta calle se realizó un ensayo similar al antes descrito pero omitiendo el agregado de ATP (-*).

El último paso consistió en determinar si el proceso de fosforilación era capaz de desestabilizar la interacción entre GST-AtY14 y MBP-AtPym una vez que el heterodímero entre ellas estuviese formado. Por lo tanto, realizamos la experiencia incubando ambas proteínas inicialmente y llevando a cabo la fosforilación luego, teniendo en cuenta los controles adecuados.

El resultado obtenido en este ensayo se ilustra en la figura 70. En esta imagen, se puede visualizar la disminución en la intensidad de la señal (calle 4) cuando el heterodímero es fosforilado, si se compara con la intensidad de la banda en la calle 5, que corresponde al mismo ensayo pero omitiendo el agregado de ATP a la mezcla de reacción. En esta experiencia, además, se repitió el experimento de fosforilación de la proteína MBP-AtPym y su efecto sobre la interacción con GST-AtY14, como control positivo (calles 2 y 3).

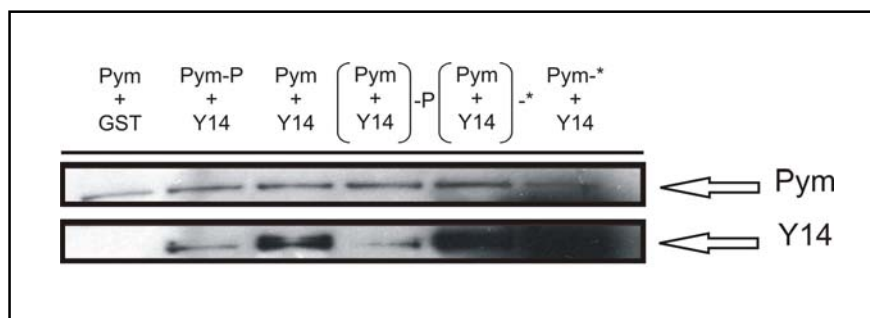


Figura 70: Ensayo de pull-down realizado con las versiones recombinantes de las proteínas AtPym y AtY14. En este caso se evaluó el efecto de la fosforilación sobre la estabilidad del heterodímero formado por estas proteínas. En las regiones superior e inferior de la imagen se visualizan las detecciones de las proteínas MBP-AtPym y GST-AtY14, respectivamente. La ausencia de banda en la primera calle demuestra que no se produjo interacción entre las proteínas MBP-AtPym y GST (control negativo de la experiencia). En la segunda calle, la proteína AtPym fue incubada previamente con el extracto de quinasas (-P), luego se adicionó AtY14 y finalmente se incubó la mezcla con la resina de amilosa. En la cuarta calle, se incubaron en una primera instancia las proteínas AtY14 y AtPym y luego con el extracto de quinasas (-P). En la quinta y sexta calle se realizaron ensayos similares a los antes descritos pero omitiendo el agregado de ATP (-*).

4.2.3.7 Efecto de la sobreexpresión de las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym sobre la expresión de genes que poseen un intrón en su región 5'UTR

En mamíferos, se ha encontrado que la traducción de los ARNm que contienen intrones en sus secuencias se lleva a cabo más eficientemente que la de aquellos transcritos idénticos pero carentes de intrones (Le Hir y col., 2003; Diem y col., 2007; Gudikote y col., 2005; Ma y col., 2008).

Como se mencionó anteriormente, estos resultados sugerirían que el rol del *splicing* en la expresión génica sería parcial o totalmente debido a la acción de los componentes del EJC (Wiegand y col., 2003). Más aún, el factor de iniciación de la traducción eIF4A-III sería capaz de “estimular” el proceso traduccional luego de la formación del complejo ribosomal 80S. Asimismo Y14, probablemente a través de su unión a la proteína Pym, aumenta la traducción de mensajeros antes de la formación del complejo 80S, sugiriendo que el rol del EJC se llevaría a cabo en múltiples etapas de este proceso (Lee y col., 2009).

Sin embargo, la función de este complejo en plantas es aún desconocida. Este hallazgo motivó nuestro interés en dilucidar si las proteínas analizadas en este trabajo eran capaces de ejercer alguna función en la expresión de ciertos genes con intrones en la región 5'UTR esenciales para la expresión.

Dado que uno de los genes en estudio (*AtPYM*) presenta en su secuencia un intrón líder de este tipo, decidimos realizar la primera experiencia utilizando a este gen como objetivo en el ensayo de sobreexpresión. A través de un sistema de agroinfiltración de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, empleando las cepas de *Agrobacterium* que contenían las construcciones que permitían la sobreexpresión de las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym, se transformaron plántulas transgénicas que contenían los vectores pBI-AtPym y pBI-AtPym(-I). Asimismo, se realizaron dos controles utilizando los vectores pBI101.3 y Hahb4-pBI121. Este último permite la expresión del factor de transcripción Hahb-4, perteneciente a la familia HDZip, teóricamente no relacionado con la expresión del gen *AtPYM*.

Siguiendo la estrategia propuesta en el apartado 2.2.9.6 de Materiales y Métodos y realizando los ensayos de transformación por triplicado, se obtuvieron los resultados representados en las figuras 71 y 72.

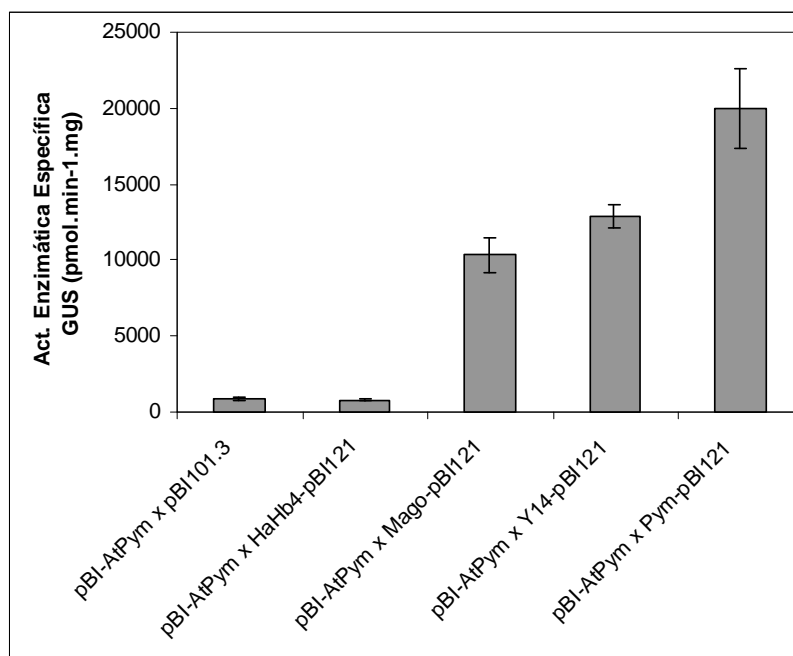


Figura 71: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas transgénicas que contienen la construcción pBI-AtPym transformadas con las cepas de *Agrobacterium* que contienen los sistemas de sobreexpresión de las proteínas de interés. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

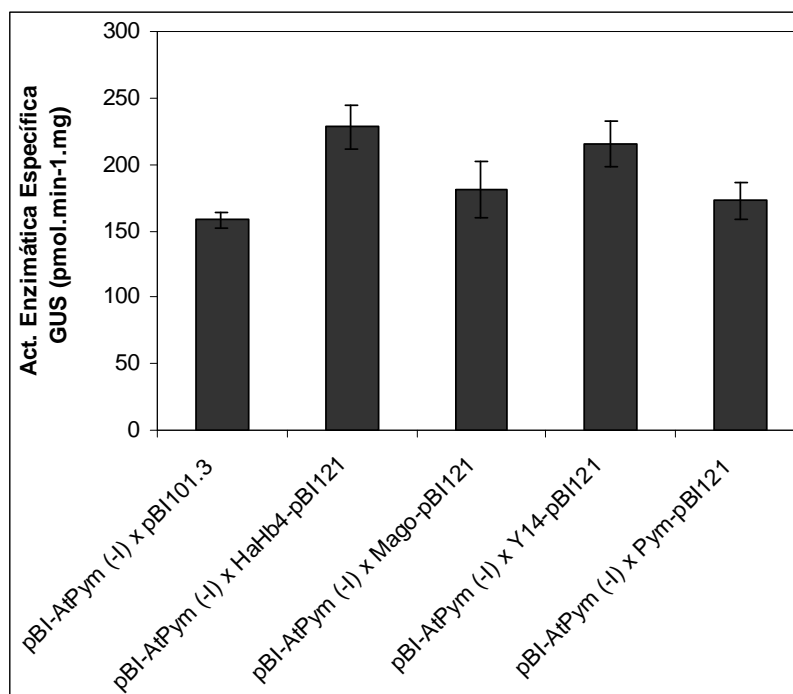


Figura 72: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas transgénicas que contienen la construcción pBI-AtPym(-I) transformadas con las cepas de *Agrobacterium* que contienen los sistemas de sobreexpresión de las proteínas de interés. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

Como se puede observar en la figura 71, la expresión de las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym en las plantas que contenían la construcción pBI-AtPym produjo incrementos en los niveles del gen reportero *gus* de 10, 12 y 20 veces, respectivamente, con respecto a las transformaciones con las construcciones control. Por otra parte, al realizar la misma experiencia con las plántulas que contenían la construcción pBI-AtPym(-I), no se pudieron observar cambios en los niveles de actividad enzimática GUS (figura 72), sugiriendo que el efecto estimulador producido por la sobreexpresión de las proteínas de interés requiere la presencia del intrón.

En vías de comprobar el comportamiento de genes similares a *AtPYM* en su estructura pero no relacionados funcionalmente, realizamos un análisis similar con otros genes con intrones en sus regiones 5'UTR y cuya funcionalidad había sido confirmada previamente en nuestro laboratorio. Los genes elegidos fueron *AtCOX5c-2* y *AtCOX17-2* y se emplearon plantas transgénicas que contenían construcciones con las regiones promotoras de estos genes y la región 5'UTR (con y sin intrón). Los ensayos de agroinfiltración permitieron obtener los resultados representados en las figuras 73 y 74, para el gen *AtCOX5c-2*, y 75 y 76, para *AtCOX17-2*.

En el caso de las plántulas que contenían la construcción pBI-AtCox5c-2, los aumentos registrados como consecuencia de la sobreexpresión de las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym fueron de unas 4 a 5 veces aproximadamente, según el caso, con respecto a los controles. Al igual que con el gen *AtPYM*, la remoción del intrón condujo a una pérdida de respuesta ante la sobreexpresión de dichas proteínas.

Una situación similar se observó con las plántulas que contenían las construcciones pBI-AtCox17-2 y pBI-AtCox17-2(-I), con la diferencia de que los incrementos registrados en el primer caso fueron de unas 14 veces, aproximadamente, con respecto a los controles.

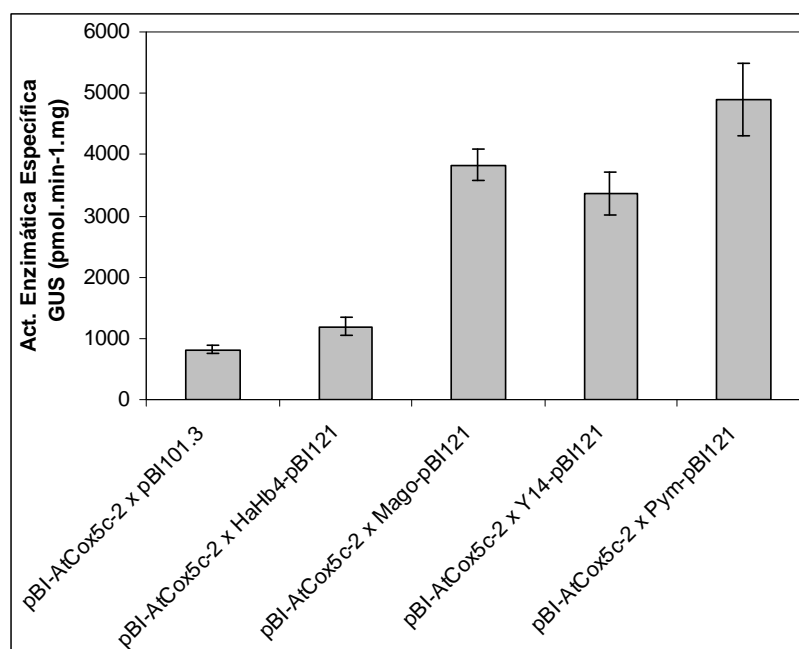


Figura 73: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas transgénicas que contienen la construcción pBI-AtCox5c-2 transformadas con las cepas de *Agrobacterium* que contienen los sistemas de sobreexpresión de las proteínas de interés. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

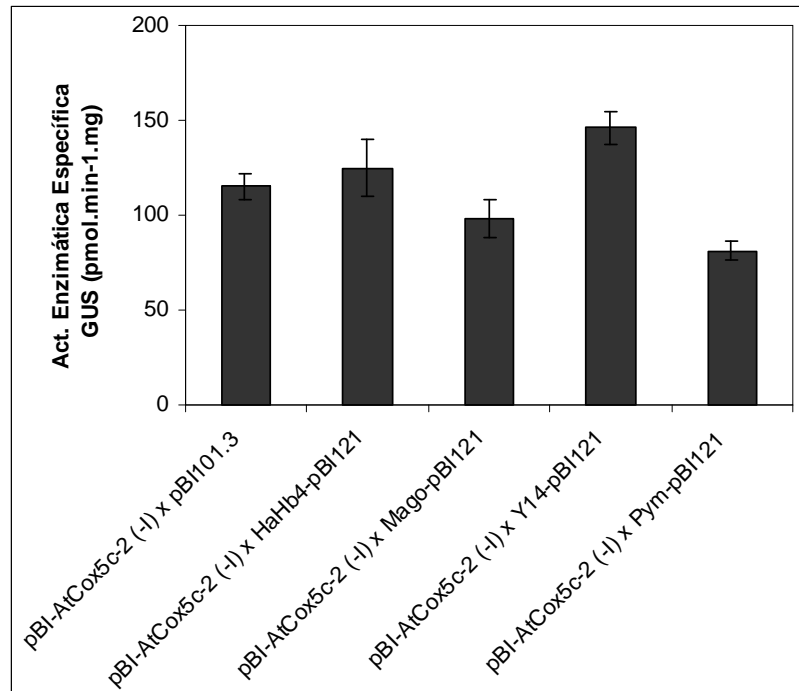


Figura 74: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas transgénicas que contienen la construcción pBI-AtCox5c-2(-I) transformadas con las cepas de *Agrobacterium* que contienen los sistemas de sobreexpresión de las proteínas de interés. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

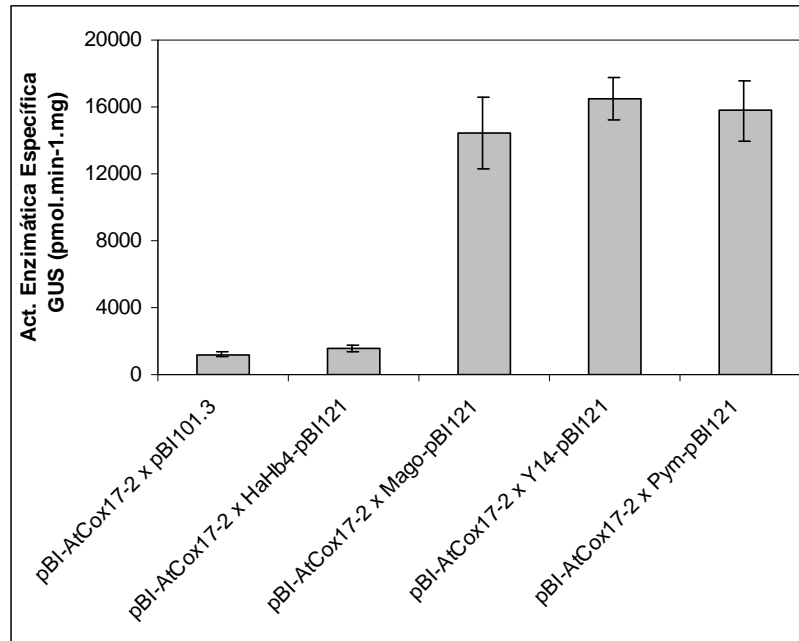


Figura 75: Niveles de actividad β-glucuronidasa en plántulas transgénicas que contienen la construcción pBI-AtCox17-2 transformadas con las cepas de *Agrobacterium* que contienen los sistemas de sobreexpresión de las proteínas de interés. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

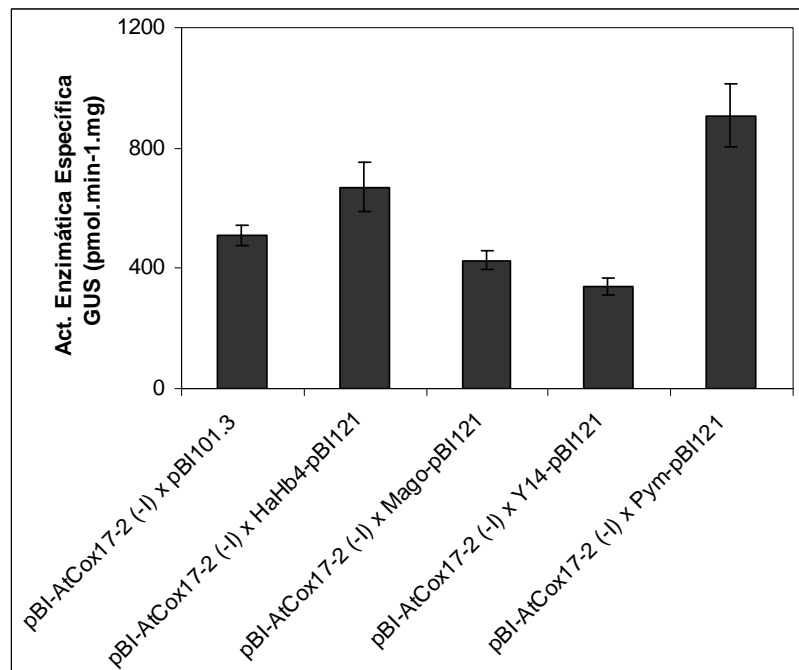


Figura 76: Niveles de actividad β -glucuronidasa en plántulas transgénicas que contienen la construcción pBI-AtCox17-2(-I) transformadas con las cepas de *Agrobacterium* que contienen los sistemas de sobreexpresión de las proteínas de interés. La actividad enzimática GUS se expresó en pmoles de 4-MU.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

4.2.4 DISCUSIÓN

La composición del complejo de la unión entre exones es muy variable. Esto se debe a que a partir de la función que desarrolle, se unirán a él diferentes proteínas. De esta manera, se han identificados proteínas que se vinculan al “núcleo” del complejo en forma estable y otras que sólo lo hacen de manera transitoria. (Tange y col., 2005).

A pesar de su composición dinámica, existen cuatro proteínas que siempre están presentes y que interactúan en forma directa o indirecta con el ARNm. Estas son: Mago, Y14, MLN51 y eIF4A-III.

Teniendo en cuenta que la existencia del EJC depende de la presencia de estas cuatro proteínas, resulta razonable pensar en la necesidad de un mecanismo coordinado que regule la expresión de estos componentes del complejo.

Por este motivo, en el presente capítulo nos propusimos dilucidar de qué manera es alcanzada la biogénesis del EJC, analizando en detalle los mecanismos involucrados en la expresión de tres proteínas del mismo en *Arabidopsis thaliana*. Dos de ellas forman un heterodímero muy estable y han sido identificadas como ortólogas de las proteínas Mago e Y14 de mamíferos y *Drosophila*, mientras que la tercera ha sido definida en la bibliografía como un factor de desensamblaje del EJC y debido a su capacidad de interacción con el mencionado heterodímero recibió el nombre de PYM (del inglés “Partner of Y14 and Mago”) (Gehring y col., 2009).

El primer paso consistió en analizar las regiones promotoras de los genes que las codifican. De este análisis, se pudo determinar la presencia de copias del elemento *site II* ubicadas en posiciones similares, con respecto al codón inicial, a las identificadas en los genes *AtCOX6*, previamente analizados en el Capítulo 1.

El segundo paso consistió en realizar un análisis funcional de estas secuencias, fusionándolas al gen reportero *gus* y transformando plantas de *Arabidopsis* con dichas construcciones.

A partir del análisis histoquímico llevado a cabo con estas plantas se pudo demostrar que existe una expresión preferencial de los genes en estudio en las regiones meristemáticas, en venas de los cotiledones y de la primera línea de hojas de plántulas de hasta 20 días de desarrollo y en granos de polen, haz vascular de la hoja y raíces, en plantas adultas de 40 días. Esta similitud en los patrones de expresión de los tres genes analizados no resulta sorprendente si se tiene en cuenta que las proteínas codificadas por los mismos forman parte de un mismo complejo multiproteico.

La tinción preferencial en las regiones meristemáticas y la identificación de los elementos *site II* en las regiones promotoras planteó el interrogante acerca del posible rol de estos últimos en la expresión de los genes en estudio. Por tal motivo, realizamos mutaciones puntuales de estos elementos en forma individual y combinada, según el caso, y ensayos de actividad GUS con las plantas transformadas con estas construcciones.

La ausencia de dos de las tres copias de elementos *site II* en el promotor del gen *AtMAGO*, ubicadas en las posiciones -114 y -101 con respecto al sitio de inicio de la traducción, condujo a una desaparición total de la expresión del gen reportero en todos los órganos analizados.

En el caso del promotor del gen *AtY14*, la situación resultó similar a la del gen *AtMAGO*, pero con ciertas particularidades. En primer lugar, las cuatro copias del elemento en cuestión se encuentran contenidas de a pares dentro de dos secuencias de 24 nucleótidos que difieren tan sólo en uno. En segundo lugar, la mutagénesis sitio dirigida de estos elementos permitió determinar que estos motivos dirigen la expresión génica en forma diferente y no solapada. Es decir, por un lado las copias ubicadas en las posiciones -265 y -254 estarían implicadas en comandar la expresión en flores, principalmente en granos de polen, mientras que las localizadas en las posiciones -164 y -153 estarían involucradas en la expresión del gen en hojas y raíz.

Cuando se realizaron las mediciones con extractos obtenidos a partir de estas plantas, se pudo determinar que la mutación de las dos copias más cercanas al codón inicial producía un efecto aún más severo sobre la expresión del gen reportero que cuando la mutación se efectuaba sobre el par ubicado hacia el extremo distal. Asimismo, se pudo verificar, a través de este análisis, el rol diferencial de cada par en dirigir la expresión hacia los distintos órganos de la planta.

En el caso del gen *AtPYM*, la mutación individual de cada copia del elemento *site II* condujo a un patrón de tinción similar al obtenido con aquellas plantas que contenían al promotor intacto. Sin embargo, la intensidad de dicha tinción resultó disminuida en estos casos. Estos resultados fueron confirmados por medio de la determinación cuantitativa de la expresión del gen reportero.

La ausencia de las dos copias, sin embargo, no condujo a una desaparición total de la tinción, sino que aún resultó detectable la expresión del gen *gus* en las regiones meristemáticas y en las venas de los cotiledones y de la primera línea de hojas. Este comportamiento se puso de manifiesto además en el análisis cuantitativo, ya que las plantas que contenían la construcción pBI-AtPym(mutS2) presentaron niveles de actividad GUS reducidos con respecto a los de las plantas transformadas con el promotor intacto, pero superiores a los del control negativo (plantas que contenían el vector pBI101.3).

La importancia de los elementos *site II* en la expresión de los genes en estudio fue corroborada a través de ensayos en geles de retardo, empleando fragmentos de las regiones promotoras que contenían estos motivos y versiones de los mismos con estos sitios mutados. De esta manera, se pudo verificar que estos elementos son capaces de reclutar factores de transcripción provenientes de un extracto de proteínas nucleares de inflorescencias de coliflor y que esta interacción involucra específicamente a estos sitios.

Para estudiar el papel del intrón ubicado en la región 5'UTR del gen *AtPYM*, se realizó la delección completa de dicho intrón y se llevaron a cabo nuevamente los ensayos de análisis de la expresión del gen *gus*.

A partir de estos estudios se pudo corroborar la importancia de esta secuencia en la expresión de dicho gen, ya que su ausencia condujo a una desaparición total de la tinción tanto en plántulas como en plantas adultas.

Cabe mencionar que el mismo resultado se obtuvo cuando se realizó la delección de la mayor parte del primer exón de dicho gen. En este caso, se mantuvieron aquellos nucleótidos necesarios para que el proceso de *splicing* se lleve a cabo. Por este motivo, el resultado obtenido no podría atribuirse a un inadecuado procesamiento del intrón, lo que conduciría posiblemente a una proteína no funcional. La explicación más satisfactoria se encontraría, quizás, en que la delección de esta secuencia dificultó el “anclaje” del EJC al ARNm a pesar de que las proteínas del mismo fuesen exitosamente reclutadas por el *spliceosoma*.

Con el fin de dilucidar el mecanismo mediante el cual estas secuencias regulan la expresión de *AtPYM* se realizaron mediciones del ARNm de *gus* y de la actividad enzimática específica GUS a partir de aquellas plantas que contenían las construcciones pBI-AtPym, pBI-AtPym(mutS2), pBI-AtPym(-I) y pBI-AtPym(-E1). Asimismo, se emplearon en este análisis plantas que contenían el vector pBI121, en las que el gen *gus* es comandado a nivel transcripcional a través del promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (35SCaMV).

Por medio de este ensayo se pudo demostrar que el transcripto correspondiente al gen reportero resultaba apenas detectable en aquellas plantas que contenían la construcción pBI-AtPym. Sin embargo, al deleccionar el intrón líder en su secuencia, la observación del transcripto por medio de la técnica de Northern blot resultó imposible. Este resultado pondría en evidencia que el intrón estaría involucrado en la estabilización del ARNm una vez sintetizado. Otra posibilidad sería que esta secuencia se encuentre implicada en forma directa en el evento transcripcional, ya que se ha reportado que los intrones son capaces de afectar la eficiencia de este proceso de diferentes maneras, ya sea debido a la presencia de elementos *enhancers* o *represores* transcripcionales, o a través de *motivos* de posicionamiento del nucleosoma que pueden influir en la eficiencia de la iniciación de la transcripción. En tal caso, los componentes del *spliceosoma*

pueden “estimular” el proceso transcripcional a nivel de su inicio y elongación (Le Hir y col., 2003). Cualquiera fuese el mecanismo que opera para que el intrón lleve a cabo su función, el resultado obtenido concuerda con la predicción obtenida a partir del algoritmo propuesto por Rose y col. (2008), que anticipaba a través de un “*IMeter score*” positivo un efecto “estimulador” por parte de esta secuencia.

Asimismo, pudimos detectar una copia de un elemento citado por Rose y col. (2008), de secuencia 5'-GATCTG-3', que potencialmente estaría involucrado en el efecto *enhancer* observado, debido a su presencia en un gran número de intrones con *IMeter score* positivo en *Arabidopsis*. Este motivo se encuentra ubicado en la posición -559 con respecto al codón inicial y su funcionalidad no ha sido determinada en este trabajo.

Un resultado similar al observado al delecionar el intrón líder del gen *AtPYM* se obtuvo en aquellas plantas que contenían la construcción pBI-AtPym(-E1). En este caso, la ausencia de transcripto se podría explicar de diferentes maneras. En primer lugar, es posible que el primer exón le confiera cierta estabilidad *per sé* al mensajero una vez que éste es sintetizado. Otra posibilidad sería que, al remover el sitio de unión del EJC, éste no se pueda “anclar” al ARNm y por lo tanto su vida media se vea disminuida severamente, o bien que su exportación al citoplasma sea estrictamente dependiente de su interacción con el complejo y por lo tanto inhibida en este contexto.

Los niveles reducidos de transcripto *gus* (al punto de resultar indetectables) en aquellas plantas transformadas con la construcción pBI-AtPym(mutS2) no resultan sorprendentes si se tienen en cuenta los resultados obtenidos con estas plantas en los ensayos de actividad.

Si bien, como se comentó anteriormente, la cantidad de transcripto observada en aquellas plantas que contenían la construcción pBI-AtPym resultó muy reducida, esto se correlaciona con los resultados obtenidos por Park y colaboradores (2007). En este trabajo, los autores encontraron cierta dificultad al intentar detectar el transcripto del gen *AtPYM* en plántulas, motivo por el cual repitieron los ensayos empleando extractos de inflorescencias.

Cabe mencionar que las mediciones de la actividad enzimática GUS mostraron que los valores de la misma en estas plantas eran de alrededor del 50% con respecto a aquellas que contenían el promotor constitutivo 35SCaMV, siendo los niveles de transcripto en las primeras de apenas el 10% con respecto a los de las segundas. Este resultado sugeriría que la función del intrón líder de *AtPYM* no sólo se produciría estabilizando al ARNm, sino también optimizando la eficiencia del proceso traduccional.

Una vez determinada la importancia de los elementos *site II* en la regulación de la expresión de los tres genes en estudio y del intrón líder en el caso particular del gen *AtPYM*, decidimos investigar qué sucedía con el resto de los genes del complejo en *Arabidopsis thaliana*.

Por tal motivo, consultamos bases de datos que nos permitieron acceder a las secuencias de sus promotores y regiones 5'UTR. De este análisis se pudo concluir que todas las proteínas del complejo en cuestión están codificadas por al menos un gen que contiene en su región promotora una o más copias del elemento *site II*. La única excepción fue AtMLN51, que si bien no presenta dicho motivo en su promotor, contiene un intrón en su región 5'UTR.

Una segunda parte de este capítulo consistió en estudiar las proteínas codificadas por los genes analizados.

En primer lugar, se evaluaron los niveles de cada una de ellas en extractos de plántulas de *Arabidopsis* de 15 días de desarrollo de tipo “salvaje”. En este ensayo, las tres proteínas pudieron ser detectadas sin inconvenientes con los anticuerpos específicos empleados.

Un análisis similar fue llevado a cabo con extractos de plántulas que contenían construcciones que permitían sobreexpresar en forma individual cada una de las proteínas en estudio. De esta manera, encontramos que las plantas que contenían mayores cantidades de AtMago o AtY14 poseían también niveles aumentados de la proteína AtPym. Sin embargo, no se detectaron niveles incrementados de AtMago ni de AtY14 en aquellas plantas que sobreexpresaban AtPym. Esto pone de manifiesto un

posible rol de AtMago y AtY14 en la regulación de la expresión génica de AtPym o bien que estas proteínas posibilitan una mayor estabilidad de AtPym a través de la formación de un complejo con la misma. La primera hipótesis se correlaciona con los resultados obtenidos con las plantas que contenían la construcción génica sin el primer exón y constituiría otra evidencia de la posible existencia de un mecanismo de regulación de la expresión de *AtPYM* que involucra al EJC.

Para complementar este estudio, se realizaron ensayos de Western Blot con estos extractos en geles nativos, de manera tal de poder comparar los niveles de EJC entre ellos. De esta manera, se encontró que el complejo constituido al menos por las tres proteínas en estudio estaba presente en mayores cantidades en extractos de plantas que sobreexpresaban AtPym.

El hecho de que las plantas que sobreexpresan AtMago o AtY14 no contengan mayores cantidades de complejo, a pesar de que en ambos casos los niveles de AtPym resultaron superiores a los de las plantas wt, puede deberse a que si bien los niveles de AtPym en estos extractos están aumentados, no son tan altos como en los extractos que sobreexpresan esta proteína bajo el comando del promotor 35SCaMV.

Previamente, en estudios realizados en humanos, se reportó la modulación de la actividad biológica de la proteína Y14 a través de su fosforilación y metilación (Hsu y col., 2005). Los autores encontraron que la proteína sería fosforilada en los residuos de serina de dos dipéptidos SR (arginina-serina) ubicados en su extremo C terminal. Asimismo, esta modificación inhibiría su interacción con otros componentes del EJC, excepto con Mago. Por su parte, la metilación permitiría la exportación nuclear de la proteína y se produciría en múltiples residuos de arginina, también ubicados en esta región de la misma. Estos procesos resultaron antagónicos y se llevan a cabo en diferentes compartimentos celulares, ya que la fosforilación ocurre en el citoplasma, mientras que la metilación ocurre en el núcleo (Hsu y col., 2005).

Este antecedente planteó el interrogante acerca de si la proteína ortóloga de *Arabidopsis* presentaría un comportamiento similar a la de humanos, más aún teniendo en cuenta que los dipéptidos SR de la proteína humana están conservados en la proteína

de la planta. Por este motivo, comenzamos el análisis evaluando el efecto de la defosforilación de extractos proteicos de plántulas wt, empleando la enzima Fosfatasa Alcalina de intestino de ternero. De esta manera, pudimos observar que a medida que incrementábamos la cantidad de enzima en el medio de reacción, el nivel de complejo también lo hacía.

Este tipo de ensayo sugería la existencia de un efecto positivo en la formación del complejo como consecuencia de la defosforilación. Sin embargo, no aportaba mayor información acerca de qué proteínas eran modificadas para que se produjese el resultado observado.

Por este motivo, decidimos evaluar si las proteínas en estudio eran capaces de ser fosforiladas. Para ello, realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* con las versiones recombinantes de las mismas. A partir de estos experimentos pudimos demostrar que tanto AtY14 como AtPym eran capaces de incorporar el ^{32}P marcado radioactivamente.

Una vez corroborado que AtY14 y AtPym podían ser fosforiladas, al menos *in vitro*, nos propusimos determinar si estas proteínas, al ser sintetizadas por la planta, eran capaces de ser defosforiladas. Para esto, incubamos los extractos que sobreexpresaban AtY14 y AtPym en presencia de la enzima Fosfatasa Alcalina. De esta manera, pudimos concluir que AtY14 podía ser defosforilada en las condiciones ensayadas. Sin embargo, los resultados obtenidos con AtPym no fueron concluyentes.

Si bien quedó demostrado que la fosforilación ejerce un rol importante en la biogénesis del complejo formado por las proteínas en estudio, nos interesó evaluar de qué manera esta modificación afecta la interacción entre ellas.

Por medio de ensayos de interacción proteína-proteína *in vitro* (“pull-down”), evaluamos por un lado la unión entre éstas y por el otro el efecto de la fosforilación sobre la misma. Cabe mencionar que un reporte previo había demostrado la capacidad de interacción entre AtPym y las otras dos proteínas en forma individual, característica distintiva con respecto a sus pares de mamíferos y *Drosophila* (Park y col., 2007). Por lo tanto, en primer lugar corroboramos estos resultados y además demostramos que la fosforilación de AtPym no inhibía su interacción con AtMago. Sin embargo, esta

modificación en AtPym producía un efecto negativo sobre la unión con AtY14. Más aún, la fosforilación de esta última también afectó su interacción con AtPym.

Por último, evaluamos el efecto de la fosforilación sobre el complejo AtY14-AtPym. Para ello, promovimos la formación del heterodímero y luego replicamos las condiciones de fosforilación. De esta manera, pudimos corroborar que esta modificación no sólo es capaz de inhibir la interacción entre estas proteínas cuando se encuentran aisladas, sino que además desestabiliza el complejo formado entre ellas.

Estos resultados proveerían una explicación adicional que ayuda a entender por qué los extractos que sobreexpresan AtMago y AtY14 presentan menores niveles de complejo en los geles nativos. Es posible que en estos casos, a pesar de que los niveles de AtPym se encuentren aumentados, exista un predominio de la especie fosforilada y por lo tanto sea inhibida la formación del complejo con las otras dos proteínas.

En este capítulo, además, se evaluó el rol de las tres proteínas analizadas sobre la expresión de genes que contienen un intrón líder. El estudio se llevó a cabo en un comienzo sobre el gen *AtPYM* por dos motivos. Por un lado, porque el mismo contiene este tipo de secuencias en su región 5'UTR, que además resultó ser esencial para su expresión. Por el otro, por su función como integrante del EJC.

De esta manera, a partir de ensayos de transformación transiente de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, se pudo demostrar que la expresión de *AtPYM* está íntimamente ligada con los niveles de las tres proteínas. Para poder atribuir el efecto observado a la presencia del intrón líder, se llevó a cabo el mismo análisis pero con la construcción génica carente del mismo.

Estos resultados, analizados en forma conjunta con los obtenidos a partir de los ensayos de Western Blot, sugerirían que el aumento de los niveles de AtPym observado en las plantas que sobreexpresan AtMago y AtY14 se debería a un aumento en la expresión del gen correspondiente, mediado por su intrón líder. Esto posiblemente se deba a que en este contexto se logre un sistema traduccional más eficiente, o bien un desensamblaje y reciclaje optimizado del EJC. Asimismo, este resultado, acompañado

de aquel obtenido al evaluar la delección del primer exón, confirmaría la hipótesis de que *AtPYM* sería directamente regulado por dicho complejo.

En este estudio también se analizaron otros genes con intrones líderes que no se encuentran directamente relacionados con el EJC. Tales fueron los genes *AtCOX5c-2* y *AtCOX17-2*. Ambos están involucrados en la biogénesis del complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la función de sus intrones fue previamente demostrada en nuestro laboratorio (Curi y col., 2005). En estos casos, la sobreexpresión de las proteínas en estudio produjo un efecto similar al observado con *AtPYM*. Estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un mecanismo de expresión génica mediada por intrones en plantas, que involucraría a las proteínas del EJC reclutadas a expensas del proceso del *splicing*.

En este capítulo se pudo demostrar que la expresión de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM* se encuentra directamente relacionada con la presencia de los elementos *site II* en sus regiones promotoras. Asimismo, en particular, la expresión de *AtPYM* requiere la presencia de su intrón líder, ya sea por la estabilidad que éste le confiere al transcripto primario, por promover mayores niveles del mismo, o porque su remoción permitiría la unión del EJC. Este complejo regularía la expresión de *AtPYM* a nivel post-transcripcional, ya sea por medio de un incremento en la estabilidad o en la exportación del transcripto hacia el citoplasma, o por permitir un proceso traduccional más eficiente.

La presencia de elementos *site II* en varios genes del EJC, y su importancia demostrada en este capítulo en tres de ellos, sugeriría la presencia de un mecanismo coordinado de la expresión génica que permitiría la biogénesis del mismo.

Por otra parte, algunos de estos genes (entre ellos *AtPYM*) presentan intrones líderes con un “IMeter score” positivo, lo que sugiere que posiblemente también estarían involucrados en la expresión de los mismos y aportarían un mecanismo adicional en su regulación.

Finalmente, las modificaciones post-traduccionales (entre ellas la fosforilación) proveerían de una tercera vía de regulación de algunos componentes del EJC, poniendo

de manifiesto la importancia de contar con varias maneras de regular la estructura y función de este complejo y, en consecuencia, la expresión de aquellos genes que dependen del mismo.

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Tesis, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- 1) A partir del estudio funcional de las regiones promotoras de los genes *AtCOX6*, se pudo establecer que la subunidad *AtCox6a* se expresa exclusivamente en granos de polen, no detectándose tinción en ningún otro órgano de la planta. Teniendo en cuenta que la esporogénesis es un proceso que demanda grandes cantidades de energía, se podría especular que esta proteína regule la actividad enzimática del complejo, de manera análoga a lo que ocurre con la subunidad *Cox6a* de levaduras, justificando de esta manera el patrón de expresión observado.
- 2) Un análisis similar llevado a cabo con los promotores de los genes *AtCOX6b* permitió determinar que los mismos comparten un patrón de expresión preferencial en las regiones meristemáticas, en las venas de los cotiledones y en la primera línea de hojas y en la raíz, en plántulas de hasta 20 días de desarrollo. En plantas adultas, su expresión se detectó en venas de las hojas, en la raíz, en granos de polen, en el receptáculo y en el estigma de la flor y de la vaina.
- 3) Por medio de acortamientos sucesivos en estas regiones promotoras, mutagénesis sitio dirigida y ensayos en geles de retardo pudimos concluir que los elementos *site II* se encuentran estrechamente vinculados con la expresión de los genes *AtCOX6b* y que posiblemente estos motivos estén involucrados en la expresión basal de estos genes. Estos resultados se encuentran en concordancia con aquellos alcanzados a partir del análisis de otros genes que codifican componentes respiratorios en *Arabidopsis*, y refuerzan la idea que sugiere la existencia de un mecanismo común que permita la expresión coordinada de los mismos.
- 4) Los cuatro genes *AtCOX6* son inducidos por etiolación y en presencia de sacarosa. En este sentido, por medio de una búsqueda minuciosa en sus

secuencias y ensayos de mutagénesis sitio dirigida, fue posible identificar en los promotores de los genes *AtCOX6b* el motivo responsable de la respuesta frente al azúcar. Este sitio contiene la secuencia 5'-TACTAA-3' y ha sido reportado previamente como un elemento de respuesta a la sacarosa en el gen que codifica la proteína Patatina en *Solanum tuberosum*.

- 5) Los genes *AtCOX6b-1* y *AtCOX6b-3* son inducidos en presencia de giberelinas (GA₃) y citoquininas (6-bencilaminopurina), respectivamente. Por medio de deleciones sucesivas en sus regiones promotoras pudimos identificar los posibles elementos responsables en cada caso. En el promotor de *AtCOX6b-1*, encontramos copias del motivo 5'-CCTTTT-3'. Este elemento fue inicialmente identificado en las regiones promotoras de genes que codifican la proteína hidrolasa y ha sido denominado "pyrimidine box". En el promotor de *AtCOX6b-3* pudimos detectar la presencia de un motivo de secuencia 5'-GATTGA-3'. Este sitio había sido reportado previamente en la bibliografía como un elemento de respuesta a citoquininas en el gen *hpr-A* de *Cucumis sativus*. Sin embargo, su función en la respuesta observada en los genes analizados no fue confirmada.
- 6) El patrón de expresión génica solapado de los genes *AtCOX6b* y su respuesta frente a la etiolación y a la sacarosa sugieren la existencia de una redundancia génica en *Arabidopsis*. Por otra parte, de la comparación de estos genes con sus ortólogos de arroz, se puede concluir que los genes *COX6b-1* y *COX6b-2* fueron originados en forma previa a la divergencia de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas durante la evolución, mientras que *AtCOX6b-3* pudo haber emergido más tardíamente a partir de *AtCOX6b-2*.
- 7) De manera análoga a lo observado en los genes *AtCOX6b*, un análisis funcional de las regiones promotoras de los genes *AtMAGO*, *AtY14* y *AtPYM* puso en evidencia el rol esencial de los elementos *site II* en la regulación de la expresión de estos genes.
- 8) En particular, el gen *AtPYM* también es regulado por su intrón líder, cuya función en este sentido es llevada a cabo a través de un incremento de la

cantidad de ARNm y de la eficiencia traduccional. Asimismo, encontramos que el aumento de la expresión génica mediada por este intrón involucraría al complejo de la unión entre exones (EJC).

- 9) Del análisis de otros componentes del EJC en *Arabidopsis thaliana*, encontramos que todas las proteínas del complejo están codificadas por al menos un gen que contiene en su región promotora copias del elemento *site II*. La única excepción fue *AtMLN51*, que no contiene este motivo en su promotor pero sí posee un intrón potencialmente funcional en su región 5'UTR. Este resultado sugiere la posible existencia de un control coordinado de la expresión génica, que permita alcanzar la biogénesis del complejo.
- 10) La estructura y función del complejo sería regulada adicionalmente a través de la fosforilación. A través de ensayos de fosforilación *in vitro* pudimos determinar que AtY14 y AtPym son capaces de incorporar ^{32}P en su estructura. En este sentido, por medio de ensayos de interacción proteína-proteína *in vitro* pudimos determinar que esta modificación post-traduccional regula la interacción entre AtY14 y AtPym. Asimismo, la desfosforilación de extractos de plántulas de *Arabidopsis* condujo a un aumento en los niveles del complejo que forman las proteínas estudiadas.
- 11) Las plantas que sobreexpresan AtMago y AtY14 contienen niveles incrementados de AtPym, pero no a la inversa. Esto pondría de manifiesto un posible rol de estas proteínas en la regulación génica de AtPym, ya sea a través de la formación de un complejo con la misma, y consecuentemente de un aumento de su estabilidad, o mediante un proceso de aumento en la expresión génica mediada por intrones.
- 12) Las plantas que sobreexpresan AtPym contienen mayores niveles de complejo con respecto a las plantas no transformadas. Sin embargo, aquellas que contienen cantidades aumentadas de AtMago y AtY14 no presentaron este comportamiento. Una explicación plausible sería que si bien los niveles de AtPym que exhiben estas plantas resultaron superiores con respecto al de las

plantas “wild type”, éstos no fueron lo suficientemente elevados como para presentar mayores cantidades de complejo. Otra posibilidad es que en estas plantas AtPym se encuentre predominantemente fosforilada y por lo tanto inhibida de formar complejo con las otras proteínas.

- 13) Las proteínas AtMago, AtY14 y AtPym estarían involucradas en el incremento de la expresión génica mediada por intrones en *Arabidopsis thaliana*. La expresión de estas proteínas provocó un aumento de la expresión del gen *AtPYM* de 10 a 20 veces, según el caso. Un comportamiento análogo observamos al realizar un estudio similar en genes con intrones líderes no relacionados en forma directa con el EJC.
- 14) Por los resultados observados, resulta evidente el rol significativo de los elementos *site II* en la regulación de varios componentes del complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y del EJC en *Arabidopsis thaliana*. La presencia de estos motivos en otros genes que constituyen los mencionados complejos sugiere la existencia de un control coordinado que permita alcanzar su biogénesis. Por otro lado, la presencia de intrones líderes potencialmente funcionales y el rol confirmado en el caso de *AtPYM*, propone además la posibilidad de una regulación a nivel transcripcional y post-transcripcional. Finalmente, las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación y posiblemente otras, proveerían de un mecanismo adicional que permita regular la estructura y función del EJC, una vez que algunos de los genes que lo constituyen se han expresado. Esta hipótesis podría confirmarse en estudios futuros que profundicen los conocimientos que se poseen acerca de la estructura y función de estos complejos de plantas.

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADNr	ADN que codifica ARN ribosomal
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
ASB	albúmina sérica bovina
ATP	adenosina trifosfato
col.	colaboradores
COX	citocromo c oxidasa
Cytc	citocromo c
Da	daltons
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dNTP	desoxinucleótidos trifosfato
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
g	gravedad
<i>gus</i>	gen que codifica la enzima β -glucuronidasa
GUS	β -glucuronidasa
h	hora/s
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
kpb	kilopares de bases
kDa	kilodaltons
LB	Luria-Bertani
Mb	megabases
min	minuto/s
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico

MS	medio de cultivo Murashige-Skoog
MU	4-metilumbelliferona
MUG	4-metilumbelliferil- β ,D-glucurónido
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PM	peso molecular
P/V	peso en volumen
ARNasa	ribonucleasa
r.p.m	revoluciones por minuto
SDS	sodio dodecil sulfato
seg	segundo/s
T	temperatura
TA	temperatura ambiente
TAE	Tris acetato EDTA
Tris	tris(hidroximetil)-aminometano
U	unidad/es
UV	ultravioleta
vol	volumen/es
V/V	volumen en volumen
X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido

7. ABSTRACT

In this Thesis we have tried to deepen the existing knowledge about the regulation mechanisms of gene expression that govern the biogenesis of complex IV from the electron transport chain of plant mitochondria. This complex is the last link in the electron transport chain in the inner mitochondrial membrane, receiving electrons from cytochrome c and transferring them to oxygen, which is reduced to produce water.

Cytochrome c oxidase is composed by protein subunits encoded in either the nuclear or the mitochondrial genome. So far, the best functionally and structurally characterized subunits are those encoded in the mitochondrial genome, which form the enzymatic core, whereas those encoded in the nuclear genome are variable depending on the organism. In plants, the cytochrome c oxidase subunits encoded in the nuclear genome that have been identified so far are: Vb, Vc, VIa and VIb.

The single gene encoding the *Arabidopsis thaliana* AtCox6a subunit has been identified from the complete genomic sequence of this species. The gene is located on chromosome 4 and encodes a protein of 102 amino acids with a molecular mass of 12 kDa.

Arabidopsis thaliana has three known genes *AtCOX6b*: *AtCOX6b-1*, *AtCOX6b-2* and *AtCOX6b-3*. The AtCox6b-1 subunit is larger than the other two, while AtCox6b-2 and -3 show great similarity between them. Cox6b subunits from rice and *Arabidopsis thaliana* show similarity in the C-terminal part. This is also reflected in the human and yeast homologs. *COX6b-1* coding regions from rice and *Arabidopsis* are separated by four introns, while those from rice *COX6b-2* and *Arabidopsis COX6b-2* and -3 genes are separated by three introns.

In the present work we have performed an analysis of the AtCox6a and AtCox6b gene promoter regions.

First, we have established the respective expression patterns through the fusion of the promoter regions to the *gus* reporter gene.

These studies indicated that the *AtCOX6a* gene is only expressed in pollen grains, while the three *AtCOX6b* genes share a very similar expression pattern, mainly in meristematic regions in 20-day-old seedlings. In adult plants, staining was evident in leaf veins and root, pollen grains and in the silique receptacle and stigma.

A careful observation of the four promoter sequences revealed the presence of a common element in all of them, previously reported in the literature as a *site II* motif. This motif, which has the sequence 5'-TGGGCC/T-3', was firstly identified in rice genes and is involved in directing expression in meristematic tissues. This element was also detected in several mitochondrial respiratory chain genes, suggesting the existence of a transcriptional coordination.

Through a study that included site-directed mutagenesis of *site II* elements, detection and quantification of the *gus* gene and electrophoresis techniques (Band Shift), we concluded that these elements are involved in regulating the expression of *AtCOX6b* genes.

Previous studies in our laboratory showed that some genes that encode complex IV subunits and cytochrome *c* in *Arabidopsis* respond to the presence of sucrose. For this reason, we have decided to evaluate the response of *AtCOX6* genes to this and other chemical and physical factors. To do this, we used the same reporter gene fusions and assessed the response to various factors measuring GUS enzyme activity.

We have demonstrated that the four genes analyzed respond to etiolation and to the presence of sucrose. In the case of *AtCOX6b* genes, we could also identify an element involved in the response to sugar. This element has the sequence 5'-TACTAA-3' and was previously identified in the potato patatin gene promoter in a similar position to that observed in the studied promoters. Mutation of this motif in the three sequences corroborated the role of this element in the observed response.

Additionally, we have observed an individual response of *AtCOX6b-1* and *AtCOX6b-3* genes when plants were incubated in the presence of gibberellin (GA3) or cytokinins (6-benzylaminopurine), respectively. Through successive shortening of the *AtCOX6b-1* gene promoter we were able to identify a possible gibberellin response element. This motif has the sequence 5'-CCTTTT -3 ' and was initially identified in the promoter regions of genes encoding barley hydrolase protein, and has been called "pyrimidine box." However, its role in the *AtCOX6b-1* gene response has not been confirmed. Also, in the *AtCOX6b-3* gene promoter we could identify four copies of a cytokinin response element with the sequence 5'-GATTGA-3'. This motif has been previously reported in the literature as a response element to this hormone in the *hpr-A* gene from *Cucumis sativus*. Its role in *AtCOX6b-3* has not been verified.

From the results of different experiments in this work, it is evident the essential role *site II* elements in *AtCOX6b* gene expression. The presence of these elements in many genes that encode proteins involved in aerobic respiration is a strong evidence of the existence of a control, at least at the transcriptional level, that allows a coordinated expression of these proteins.

A second part of this work consisted in the study of the mechanism by which some introns are able to participate in the increase of gene expression.

Previously in our laboratory we found that the leader intron of genes that encode the *AtCox5c* subunit in *Arabidopsis thaliana* directs expression to specific tissues and promotes high expression levels through an increase in the amount of transcript and translation efficiency.

For this reason, we have begun to study some proteins belonging to a complex known as "Exon Junction Complex" (EJC), previously characterized in mammals and *Drosophila*, and directly involved in Intron Mediated Enhancement (IME) of gene expression.

This multiprotein complex is located in a conserved position, 20-24 nucleotides upstream from each exon-exon junction. It is deposited onto the mRNA as a result of splicing and determines various events of its metabolism. The complex contains more than 20 different proteins, of which eIF4A-III, Y14, Mago and MLN51 form a tetrameric core which acts as a platform to anchor other components, and are so far the most structurally and functionally characterized. Its functions are diverse and include transport and subcellular localization of some mRNAs, increased stability and translation efficiency and also monitoring and degradation of truncated mRNAs, a process known as “Non-sense Mediated mRNA Decay” (NMD).

In this work we have tried to determine how EJC biogenesis occurs, studying in depth three of its proteins in *Arabidopsis thaliana*: AtMago, AtY14 and AtPym. Each of them is encoded by a single gene in the plant genome. Mago and Y14 form a very stable heterodimer, both *in vivo* and *in vitro*, and constitute a part of the EJC core with MLN51 and eIF4-AIII. Pym, however, is not permanently associated with the complex and, at least in humans, it has been associated with the destabilization of the interaction of the EJC with mRNA.

We have begun the analysis by characterizing the promoter regions of the three genes of interest, and we identified the presence of copies of the *site II* element in all of them. Additionally, in the case of *AtPYM*, we detected the presence of an intron located in its 5'UTR.

From the study of *gus* reporter gene fusions we have found that there was an expression pattern shared by the three genes. Expression was detected mainly in meristematic regions in 20 day-old seedlings, and in leaf veins, root, pollen grains and in flower receptacle and stigma, in adult plants. In addition, it was determined, through *site II* mutation combined with *gus* reporter gene detection and Band Shift assays, that these elements are essential in expression of the analyzed genes.

The presence of an intron in the *AtPYM* gene 5'UTR region prompted us to evaluate the effect of its deletion. Taking into account the role of AtPym as an EJC component, deletion of its first exon has also been included in this analysis.

In both cases it was impossible to detect reporter gene expression in any organ from plants that carried these gene constructs. This would highlight that *AtPYM* gene expression is regulated by both, *site II* elements and its leader intron through a mechanism that would involve the EJC.

In order to elucidate the role of the *AtPYM* leader intron in expression, *gus* transcript levels and GUS enzyme activity were determined. These assays allowed us to conclude that the presence of this intron would be critical in gene expression, and would be linked to increased transcript levels and translational efficiency.

From analysis of other EJC components in *Arabidopsis*, we have concluded that all the proteins are encoded by at least one gene that contains *site II* elements. The only exception was *AtMLN51* that does not contain this motif in its promoter and contains an intron in its 5'UTR.

Experiments in which we evaluated the expression of the three studied proteins allowed us to conclude that AtMago and AtY14 overexpression leads to an increase in the amounts of AtPym, but not *vice versa*.

In addition, we have evaluated the effect of a post-translational modification (i.e. phosphorylation) of proteins encoded by the analyzed genes on the interaction between them.

Using *in vitro* phosphorylation assays we could demonstrate that AtY14 and AtPym are able to incorporate ³²P. Through Western Blot experiments in native conditions and *in vitro* protein-protein interaction (pull-down) assays, we have shown that this modification regulates the AtY14-AtPym interaction, and possibly the EJC assembly and disassembly in *Arabidopsis*.

In addition, *Arabidopsis* transient transformation assays have shown that the proteins under study would be involved in Intron Mediated Enhancement of gene expression. Overexpression of each of them led to increases of up to 20 times in *gus* reporter gene expression when plants carrying the *AtPYM* gene promoter were analyzed. Similar results were obtained when other genes unrelated to the EJC but with leader introns were analyzed.

The presence of *site II* elements in several EJC component genes and their demonstrated importance in three of them in this work suggest the existence of a coordinated mechanism of gene expression that would optimize the complex biogenesis.

Moreover, some of these genes (including *AtPYM*) have potentially functional leader introns, suggesting that they may also be involved in expression, probably through the EJC.

Finally, post-translational modifications (among them phosphorylation) would provide a third means of regulation of some EJC components. These facts highlight the importance of the regulation of both, the structure and function of this complex, and consequently of the expression of genes that depend on it.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abramson J., Svensson-Ek M., Byrne B. and Iwata S. (2001).** Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1544: 1-9.
2. **Adams K. L., Song K., Roessler P. G., Nugent J. M., Doyle J. L., Doyle, J. J. and Palmer, J. D. (1999).** Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in lugumes. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, 96 (24): 13863-13868.
3. **Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. (2003).** *Biología Molecular de la Célula. Conversión energética: mitocondria y cloroplastos.* Ediciones Omega. Barcelona, España.
4. **Andersen C. B. F., Ballut L., Johansen J. S., Chamieh H., Nielsen K. H., Cristiano L. P., Oliveira J. S., Pedersen B. S., Le Hir H., Andersen G. R. (2006).** Structure of the Exon Junction Core Complex with a Trapped DEAD-Box ATPase Bound to RNA. *Science*, 313(5795): 1968 – 1972.
5. **Attallah C. V., Welchen E. and Gonzalez D. H. (2007)-a.** The promoters of *Arabidopsis thaliana* genes *AtCOX17-1* and *-2*, encoding a copper chaperone involved in cytochrome c oxidase biogenesis, are preferentially active in roots and anthers and induced by biotic and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 129: 123–134.
6. **Attallah C. V., Welchen E., Pujol C., Bonnard G. and Gonzalez D. H. (2007)-b.** Characterization of *Arabidopsis thaliana* genes encoding functional homologues of the yeast metal chaperone Cox19p, involved in cytochrome c oxidase biogénesis. *Plant Molecular Biology*, 65: 343–355.
7. **Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. (1987).** *Current Protocols in Molecular Biology.* Greene Publishing and Wiley Intersciencie New York.

8. **Baker K. E. and Parker R. (2004).** Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expresión. *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 293–299.
9. **Balandin T. and Castresana C. (2002).** *AtCOX17*, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone Cox17. *Plant Physiology*, 129: 1852-1857.
10. **Ballut L., Marchadier B., Baguet A., Tomasetto C., Séraphin B. And Le Hir H. (2005).** The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nature Structural and Molecular Biology*, 12: 861 – 869.
11. **Barros M. H., Carlson C. G., Glerum D. M. and Tzagoloff A. (2001).** Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O. *FEBS Letters*, 492 (1-2): 133-138.
12. **Basu A. and Avadhani N. G. (1991).** Structural organization of nuclear gene for subunit Vb of mouse mitochondrial cytochrome c oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 (23): 15450-15456.
13. **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 Molecular Biology*, 37 (5): 859-869.
14. **Birnboim H. and Dolly J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7: 1513-1515.
15. **Blanchard J. and Lynch M. (2000).** Organellar genes: why do they end up in the nucleus? *Trends in Genetics*, 16 (7): 315-320.
16. **Blencowe B. J., Issner R., Nickerson J. A. and Sharp P. A. (1998).** A coactivator of pre-mRNA splicing. *Genes and Development*, 12: 996–1009.
17. **Blencowe, B. J., G. Bauren, A. G. Eldridge, R. Issner, J. A. Nickerson, E. Rosonina, and P. A. Sharp (2000).** The SRm160/300 splicing coactivator subunits. *RNA*, 6: 111–120.

18. **Bolle C., Herrmann R. G. and Oelmuller R. (1996).** Intron sequences are involved in the plastid and light dependent expression of the spinach *PsaD* gene. *The Plant Journal*, 10(5), 919-924.
19. **Bonnefoy N., Chalvet F., Hamel P., Slonimski P. P. and Dujardin G. (1994).** OXA1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 329 (2): 201-212.
20. **Bono F., Ebert J., Unterholzner L., Guttler T., Izaurralde E. and Conti, E. (2004).** Molecular insights into the interaction of PYM with the Mago-Y14 core of the exon junction complex. *EMBO*, 5: 304–310.
21. **Bono F., Ebert J., Lorentzen E, and Conti E. (2006).** The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell*, 126: 713–725.
22. **Bourdon V., Harvey A. and Lonsdale D. M. (2001).** Introns and their positions affect the translational activity of mRNA in plant cells. *EMBO reports*, 21(51): 394-398.
23. **Buchman, A. R. and Berg, P. (1988).** Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 8: 4395–4405.
24. **Callis J., Fromm M., Walbot V. (1987).** Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes and Development*, 1: 1183-1200.
25. **Capaldi R. A. (1990).** Structure and Function of Cytochrome c Oxidase. *Annual Review of Biochemistry*, 59: 569-596.
26. **Carlson C. G., Barrientos A. Tzagoloff A. and Glerum D. M. (2003).** COX16 encodes a novel protein required for the assembly of cytochrome oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (6): 3770-3775.

-
27. **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.
 28. **Carr H. S., George G. N. and Winge D. (2002).** Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome c oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein. The Journal of Biological Chemistry, 277 (34): 31237-31242.
 29. **Caspar T. and Quail, P. H. (1993).** Promoter and leader regions involved in the expression of the *Arabidopsis ferredoxin A* gene. Plant Journal, 3: 161–174.
 30. **Castresana J., Lubben M., Saraste M. and Higgins D. G. (1994).** Evolution of cytochrome c oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. EMBO Journal, 13 (11): 2516-2525.
 31. **Chang Y., Saadi Imam J. and Wilkinson M. F. (2007).** The Nonsense-Mediated Decay RNA Surveillance Pathway. Annual Review of Biochemistry, 76: 51–74.
 32. **Gasser C., Simonsent J. W., Schilling and Schimke R. T. (1982).** Expression of abbreviated mouse dihydrofolate reductase genes in cultured hamster cells. Proceedings of the National Academy of Science. U.S.A, 79: 6522-6526.
 33. **Chen Y., Shaw J., Chung M. and Chu F. (2007).** Molecular identification and characterization of Tcmago and TcY14 in Taiwan (Taiwania cryptomerioides). Tree Physiology, 27: 1261–1271.
 34. **Chia C., Chan J. E. , Diem M. D., Feng W., Mann M., Rappsilber J. and Dreyfuss G. (2004).** eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. RNA, 10: 200–209.
 35. **Christensen A. H., Sharrock R. A., and Quail P. H. (1992).** Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Molecular Biology, 18: 675-689.

-
36. **Clough S. J. and Bent A. F. (1998).** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16: 735-743.
37. **Comelli R. N., Gonzalez D. H. (2009).** Identification of regulatory elements involved in expression and induction by sucrose and UV-B light of the *Arabidopsis thaliana* COX5b-2 gene, encoding an isoform of cytochrome c oxidase subunit 5b. *Physiologia Plantarum*, 137: 213-224.
38. **Cordelia B., Reinhold G. Herrmann and Ralf Oelmuller (1996).** Intron sequences are involved in the plastid and light dependent expression of the spinach *PsaD* gene. *Plant Journal*, 10 (5): 919-924.
39. **Coyne H. J., Ciofi-Baffoni S., Banci L., Bertini I., Zhang L., George G. N., Winge D.R. (2007).** The characterization and role of zinc binding in yeast Cox4. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 8926-8934.
40. **Cui Y, Hagan K. W., Zhang S. and Peltz S. W. (1995).** Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes and Development*, 9: 423-436.
41. **Culbertson M. R. (1999).** *Trends Genet.* RNA surveillance: unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer, 15: 74-80.
42. **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*, 163: 897-905.
43. **Curi G. C., Welchen E., Chan R. L. and Gonzalez D. H. (2003).** Nuclear and mitochondrial genes encoding cytochrome c oxidase subunits respond differently to same metabolic factors. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41:689-693.
44. **Curi G. C., Chan R. L. and Gonzalez D. H. (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 Experimental Botany*, 56 (419):2563-2571.
45. **Czaplinski K., Ruiz-Echevarria M. J., Paushkin S. V., Han X. and Weng Y. (1998).** The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes and Development*, 12: 1665–1677.
46. **Das J., Miller S. T., Stern D. L. (2004).** Comparison of diverse protein sequences of the nuclear-encoded subunits of cytochrome c oxidase suggests conservation of structure underlies evolving functional sites. *Molecular Biology and Evolution*, 21 (8): 1572-1582.
47. **Day D. A. and Wiskich J. T. (1995).** Regulation of alternative activity in higher plants. *Journal of Bioenergetic and Biomembranes*, 27: 379-385.
48. **De la Cruz, J., Kressler, D. and Linder, P. 1999.** Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends in Biochemical Science*, 24: 192–198.
49. **de Paula J. C., Peiffer W. E., Ingle R. T., Centeno J. A., Ferguson-Miller S. and Babcock G. T. (1990).** Hemes a and a₃ environments of plant cytochrome c oxidase. *Biochemistry*, 29: 8702-8706.
50. **Dean C., Favreau M., Bond-Nutter D., Bedbrook J. and Dunsmuir, P. (1989)** Sequences downstream of translation start regulate quantitative expression of two petunia *rbcS* genes. *Plant Cell*, 1: 201-208.
51. **Dickey L. F., Nguyen T. T., Allen G. C. and Thompson W. F. (1994).** Light modulation of *ferredoxin* mRNA abundance requires an open reading frame. *Plant Cell*, 6: 1171–1176.
52. **Dickey L. F., Petracek M. E., Nguyen T. T., Hansen E. R. and Thompson W. F. (1998).** Light regulation of *fed-1* mRNA requires an element in the 5' Untranslated Region and correlates with differential polyribosome association. *Plant Cell*, 10: 475–484.

-
53. **Diem M. D., Chan C. C., Younis I., Dreyfuss G. (2007).** PYM binds the cytoplasmic exon junction complex and ribosomes to enhance translation of spliced mRNAs. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14: 1173–1179.
54. **Dostie J. and Dreyfuss, G. (2002).** Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Current Biology*, 12: 1060–1067.
55. **Drouin G. and Dover J. L. (1987).** A plant processed pseudogene. *Nature*, 328: 557-558.
56. **Eldridge, A. G., Y. Li, Sharp P. A. and B. J. Blencowe (1999).** The SRm160/300 splicing coactivator is required for exon-enhancer function. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, 96: 6125–6130.
57. **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 Physiology*, 136: 4072-4087.
58. **Elorza A., Roschzttardtz H., Gómez I., Mouras A., Holuigue L., Araya A. and Jordana X. (2006).** A nuclear gene for the iron-sulfur subunit of mitochondrial complex II is specifically expressed during *Arabidopsis* seed development and germination. *Plant and Cell Physiology*, 47 (1): 14-21.
59. **Feinberg A. and Vogelstein B. (1983).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 132: 6-13.
60. **Ferraiuolo M. A., Lee C., Ler L. W., Hsu J. L., Costa-Mattioli M., Luo M. J., Reed R. and Sonenberg N. (2004).** A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, 101 (12): 4118–4123.

-
61. **Figueroa P., Leon G., Elorza A., Holuigue L., Araya A. and Jordana X. (2002).** The four subunits of mitochondrial respiratory complex II are encoded by multiple nuclear genes and targeted to mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 50: 725-734.
62. **Fiori A., Saliola M., Goffrini P. and Falcone C. (2000).** Isolation and molecular characterization of *KICOX14*, a gene of *Kluyveromyces lactis* encoding a protein necessary for the assembly of the cytochrome oxidase complex. *Yeast*, 16 (4): 307-314.
63. **Fleckner, J., Zhang, M., Valcarcel, J. and Green, M.R. (1997).** U2AF65 recruits a novel human DEAD box protein required for the U2 snRNP-branchpoint interaction. *Genes and Development*, 11: 1864–1872.
64. **Forler D., Kocher T., Rode M., Gentzel M., Izaurralde E. and Wilm M. (2003).** An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nature Biotechnology*, 21: 89–92.
65. **Forsha D., Church C., Wazny P. and Poyton R. O. (2001).** Structure and function of Pet100p, a molecular chaperone required for the assembly of cytochrome c oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry Society Transactions*, 29 (4): 436-441.
66. **Fратиanni A., Pastore D., Pallotta M.L., Chiatante D., Passarella S. (2001).** Increase of membrane permeability of mitochondria isolated from water stress adapted potato cells. *Bioscience Reports* 21: 81–91.
67. **Fribourg S., GatWeld D., Izaurralde E., Conti E. (2003).** A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14-Mago complex. *Nature Structural and Molecular Biology*, 10: 433–439.
68. **Frischmeyer P.A. and Dietz H. C. (1999).** Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Human Molecular Genetics*, 8: 1893–1900.
69. **Gehring N. H., Lamprinaki S., Kulozik A. E. and Hentze M. W. (2009).** Disassembly of Exon Junction Complexes by PYM. *Cell*, 137: 536–548.

-
70. **Gidekel M., Jiménez B. and Herrera-Estrella L. (1996).** The first intron of the *Arabidopsis thaliana* gene coding for elongation factor 113 contains an enhancer-like element. *Gene*, 170: 201-206.
71. **Glerum D. M., Shtanko A. and Tzagoloff A. (1996).** SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (34): 20531-20535.
72. **Glerum D. M., Muroff I., Jin C. and Tzagoloff A. (1997).** *COX15* codes for a mitochondrial protein essential for the assembly of yeast cytochrome oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (30): 19088-19094.
73. **Gong D., Guo Y., Jagendorf A. and Zhu, J. (2002).** Biochemical characterization of the *Arabidopsis* protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiology*, 130: 256–264.
74. **Gonzalez C. I., Wang W. and Peltz S. W. (2001).** Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*: a quality control mechanism that degrades transcripts harboring premature termination codons. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 66: 321–328.
75. **Gray M., Hanic-Joyce, P. and Covello P. (1992).** Transcription, processing and editing in plant mitochondria. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 145-175.
76. **Grierson C., Du J. S., Zabala M. T., Beggs K., Smith C., Holdsworth M., Bevan M. (1994).** Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant Journal*, 5: 815-826.
77. **Grooskopf D. and Mulligan R. (1996).** Developmental and tissue-specificity of RNA editing in mitochondria of suspension-cultured maize cells and seedlings. *Current Genetics*, 29: 556-563.

-
78. **Gudikote J. P., Imam J. S., Garcia R. F., Wilkinson M. F. (2005).** RNA splicing promotes translation and RNA surveillance. *Nature Structural and Molecular Biology*, 12: 801–809.
79. **Hachet, O. and Ephrussi, A. (2001).** *Drosophila* Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport. *Current Biology*, 11: 1666–1674.
80. **Hachet O. and Ephrussi A. (2004).** Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature*, 428: 959-963.
81. **Hamer D. H., and P. Leder (1979).** SV40 recombinants carrying a functional RNA splice junction and polyadenylation site from the chromosomal mouse pmai globin gene. *Cell*, 17: 737-747.
82. **Hanahan D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166: 557-580.
83. **Hell K., Tzagoloff A., Neupert W. and Stuart R. A. (2000).** Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (7): 4571-4578.
84. **Ho L. H., Giraud E., Lister R., Thirkettle-Watts D., Low J., Clifton R., Howell K. A., Carrie C., Donald T. and Whelan J. (2007).** Characterization of the regulatory and expression context of an alternative oxidase gene provides insights into cyanide-insensitive respiration during growth and development. *Plant Physiology*, 143: 1519-1533.
85. **Höfgen R. and Willmitzer L. (1988).** Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research*, 16: 9977.
86. **Horn R., Hustedt J., 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 Molecular Biology*, 30: 523-538.

-
87. **Hsu I., Hsu M., Li C., Chuang T., Lin R. and Tarn W. (2005).** Phosphorylation of Y14 Modulates Its Interaction with Proteins Involved in mRNA Metabolism and Influences Its Methylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (41): 34507–34512.
88. **Huang M. T.F., Gorman C. M. (1990).** Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Research*, 18: 937-947.
89. **Ibba M. and Soll D. (1999).** Quality Control Mechanisms During Translation. *Science*, 286: 1893–97.
90. **Jefferson R. A. (1987).** Assaying Chimeric genes in Plants: The *GUS* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5 (4): 387-405.
91. **Jefferson R. A., Kavanagh T. A. and Bevan M. W. (1987).** *Gus* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*, 6: 3901-3907.
92. **Jensen T. H., Boulay J., Rosbash M. and Libri D. (2001).** The DECD box putative ATPase Sub2p is an early mRNA export factor. *Current Biology*, 11: 1711–1715.
93. **Jeon J., Lee S., Jung K., Jun S., Kim C., and Gynheung A. (2000).** Tissue-Preferential expression of a rice *α -Tubulin* gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiology*, 123: 1005–1014.
94. **Jin G., Davey M. C., Ertl J. R., Chen R., Yu Z., Daniel S. G., Becker W. M. and Chen C. (1998).** Interaction of DNA-binding proteins with the 5'-flanking region of a cytokinin-responsive cucumber hydroxypyruvate reductase gene. *Plant Molecular Biology*, 38: 713-724.
95. **Jin Y., Leea S. H., Park K. Y. (2004).** A leader intron and 115-bp promoter region necessary for expression of the carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene in the pollen of transgenic tobacco. *FEBS Letters*, 578: 229–235.

-
96. **Jofuku K. D., Schipper R. D. and Goldberg R. B. (1989).** A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. *Plant Cell*, 1: 567.
97. **Johnson M. A., von Besser K., Zhou Q., Smith E., Aux G., Patton D., Levin J. Z., Preuss D. (2004).** *Arabidopsis* hapless mutations define essential gametophytic functions. *Genetics*, 168: 971–982.
98. **Kang H. G. and Singh K. B. (2000).** Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis* Dof domain proteins: Overexpression of OBP3 leads to growth defects. *Plant Journal*, 21: 329-339.
99. **Kashima I., Yamashita A., Izumi N., Kataoka N. and Morishita R. (2006).** Binding of a novel SMG-1-Upf1- eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes and Development*, 20: 355–367.
100. **Khalimonchuk O. and Rödel G. (2005).** Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, 5 (6): 363-388.
101. **Kim Y. J., Lee S. H., Park K. Y. (2004).** A leader intron and 115-bp promoter region necessary for expression of the carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene in the pollen of transgenic tobacco. *FEBS Letters*, 578: 229–235.
102. **Klein R. R., Burke J. J., Wilson R. F. (1986).** Effect of osmotic stress on ion transport processes and phospholipid composition of wheat (*Triticum aestivum* L.) mitochondria. *Plant Physiology*, 82: 936–941.
103. **Knoop, V. (2004).** The mitochondrial DNA of land plants: peculiarities in phylogenetic perspective. *Current Genetics*, 46: 123–39.
104. **Koroleva O. A., Calder G., Pendle A. F., Kim S. H., Lewandowska D., Simpson C. G., Jones I. M., Brown J. W. S. and Shaw P. J. (2009).** Dynamic Behavior of *Arabidopsis* eIF4A-III, putative core protein of Exon Junction

- Complex: Fast relocation to nucleolus and splicing speckles under hypoxia. *The Plant Cell*, 21: 1592–1606.
105. **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 Journal*, 7: 877-886.
106. **Laemmli U. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
107. **Lam E., Kano-Murakami Y., Gilmartin P., Niner B., Chua N. H. (1990).** A metal-dependent DNA-binding protein interacts with a constitutive element of a light-responsive promoter. *Plant Cell*, 2: 857-866.
108. **LaMarche A. E., Abate M. I., Chan S. H. and Trumpower B. L. (1992).** Isolation and characterization of *COX12*, the nuclear gene from previously unrecognized subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (31): 22473-22480.
109. **Lang, B. F., Burger G., O'Kelly C. J., Cedergren R., Golding G. B., Lemieux C., Sankoff D., Turmel M., Gray M. W. (1997).** An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, 387 (6632): 493-497.
110. **Lau C., Diem M. D., Dreyfuss G., and Van Duyne G. D. (2003).** Structure of the Y14-Magoh core of the Exon Junction Complex. *Current Biology*, 13: 933–941.
111. **Le Hir H., Izaurralde E., Maquat L. E. and Moore M. J. (2000).** The spliceosome deposits multiple proteins of mRNA exon-exon junctions. *The EMBO Journal*, 19 (24): 6860-6869.
112. **Le Hir H., Nott A. and Moore M. J. (2003).** How introns influence and enhance eukaryotic gene expression, *TRENDS in Biochemical Sciences*, 28 (4): 215–220.

-
113. **Lee B. S. and Culbertson M. R. (1995).** Identification of an additional gene required for eukaryotic nonsense mRNA turnover. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, 92: 10354–10358.
114. **Lee H. C., Choe J., Chi S., Kim Y. K. (2009).** Exon Junction Complex enhances translation of spliced mRNAs at multiple steps. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384: 334–340.
115. **Leeds P, Wood J. M., Lee B. S. and Culbertson M. R. (1992).** Gene products that promote mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 12: 2165–2177.
116. **Lejeune F., Ishigaki Y., Li X. and Maquat L. E. (2002).** The Exon Junction Complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO Journal*, 21: 3536–3545.
117. **Lejeune F. and Maquat L. E. (2005).** Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 17: 309–315.
118. **Lewin B. (2004).** *Genes VIII*. Oxford University Press. Printed in the United States of America.
119. **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.
120. **Li J. F., Park E., Albrecht G., von Arniml A. G., Nebenführ A. (2009).** The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Methods*, 5(6): 1746-4811.
121. **Li Q., Imataka H., Morino S., Rogers G. W., Richter-Cook N. J., Merrick W. C. and Sonenberg N. (1999).** Eukaryotic translation Initiation Factor 4AIII

- (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11): 7336-7346.
122. **Li S. and Wilkinson M. F. (1998)**. Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity*, 8: 135–41.
123. **Libri D., Graziani N., Saguez C. and Boulay J. (2001)**. Multiple roles for the yeast *SUB2/UAP56* gene in splicing. *Genes and Development*, 15: 36–41.
124. **Lodish H., Berk A., Zipursky S., Matsudaira P., Baltimore D. and Darnell J. (2005)**. *Biología Celular y Molecular. Energética celular: glucólisis, oxidación aeróbica y fotosíntesis*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
125. **Lopes Souza R., Green-Willms N. S., Fox T. D., Tzagoloff A. and Nobrega F. (2002)**. Cloning and characterization of *COX18*, a *Saccharomyces cerevisiae* *PET* gene required for the assembly of cytochrome oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (20): 14898-14902.
126. **Lu, S. and Cullen, B. R. (2003)**. Simian virus 40 late transcripts lacking excisable intervening sequences are defective in both stability in the nucleus and transport to the cytoplasm. *RNA*, 9: 618–630.
127. **Luehrsen K. R. and Walbot V. (1991)**. Intron enhancement of gene expression and splicing efficiency of introns in maize cells. *Molecular Genetics and Genomics*, 225: 81-93.
128. **Luo, M. J. and Reed, R. (1999)**. Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, 96: 14937–14942.
129. **Lyu, W. S. and Mertz J. E. (1989)**. HnRNP L binds a cis-acting RNA sequence element that enables intron-independent gene expression. *Journal of Virology*, 63: 4386–4394.
130. **Ma X. M., Yoon S. O., Richardson C. J., Julich K., Blenis J. (2008)**. SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell*, 133: 303–313.

-
131. **Macchi P., Kroening S., Palacios I. M., Baldassa S., Grunewald B., Ambrosino C., Goetze B., Lupas A., St Johnston D. and Kiebler, M. (2003).** Barentsz, a new component of the Staufen-containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufen in an RNA-dependent manner. *Journal of Neuroscience*, 23: 5778–5788.
132. **Mackenzie S. and McIntosh L. (1999).** Higher Plant Mitochondria. *Plant Cell*, 11: 571-585.
133. **MacMorris M., Brocker C. and Blumenthal T. (2003).** UAP56 levels affect viability and mRNA export in *Caenorhabditis elegans*. *RNA*, 9: 847–857.
134. **Maliga P., Klessig D. F., Cashmore A. R., Gruissem W. and Varner J. E. (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: 233-260.
135. **Maquat L. E. and Carmichael G. (2001).** Quality control of mRNA function. *Cell*, 104: 173–176.
136. **Maquat L. E. (2004).** Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 89–99.
137. **Mayeda A., Badolato J., Kobashashi R., Zhang M. Q., Gardiner E. M. and Krainer A. R. (1999).** Purification and characterization of human RNPS1: a general activator of pre-mRNA splicing. *The EMBO Journal*, 18 (16), 4560-4570.
138. **McCracken S., Lambermon M. and Blencowe B. J. (2002).** SRm160 Splicing Coactivator Promotes Transcript 3' End Cleavage. *Molecular and Cellular Biology*, 22 (1): 148–160.
139. **McElroy D., Zhang W., Cao J. and Wu R. (1990).** Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*, 2: 163–171.
140. **Mena M., Cejudo F. J., Lamoneda I. I., Carbonero P. (2002).** A Role for the DOF Transcription Factor BPBF in the Regulation of Gibberellin-Responsive Genes in Barley Aleurone. *Plant Physiology*, 130: 111-119.

-
141. **Millar A., Eubels H., Jansch L, Kruft V., Heazlewood J. and Braun H. (2004).** Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. *Plant Molecular Biology*, (1): 77-90.
142. **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.
143. **Milosevic N. and Slusarenko A. J. (1996).** Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49: 143-158.
144. **Mohr, S. E., Dillon, S. T. and Boswell, R. E. (2001).** The RNA-binding protein Tsunagi interacts with Mago Nashi to establish polarity and localize oskar mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Genes and Development*, 15: 2886–2899.
145. **Moller I. M. and Rasmusson A. G. (1998).** The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends in Plant Science*, 3: 21-27.
146. **Mooney B. and Harmeý M. A. (1996).** The occurrence of hsp70 in the outer membrane of plant mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218: 309-313.
147. **Morello L., Bardini M., Sala F. and Breviario D. (2002).** A long leader intron of the *Ostub16* rice β -tubulin gene is required for high-level gene expression and can autonomously promote transcription both *in vivo* and *in vitro*. *The Plant Journal*, 29 (1): 33-44.
148. **Mun J., Leea S., Yu H., Jeong Y., Shin M., Kim H., Lee I., Kim S. (2002).** Petunia actin-depolymerizing factor is mainly accumulated in vascular tissue and its gene expression is enhanced by the first intron. *Gene*, 292: 233–243.
149. **Muna J.,1, Leea S, Yub H., Jeonga Y., Shina M., Kima H., Leea I., Kim S (2002).** Petunia actin-depolymerizing factor is mainly accumulated in vascular tissue and its gene expression is enhanced by the first intron. *Gene*, 292: 233–243.

150. **Nagano Y., Inaba T., Furuhashi H., Sasaki Y. (2001).** Trihelix DNA-binding protein with specificities for two distinct cis-elements: both important for light down-regulated and dark-inducible gene expression in higher plants. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 22238-22243.
151. **Newmark, P. A. and Boswell, R. E (1994).** The Mago Nashi locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in *Drosophila*. *Development*, 120: 1303–1313.
152. **Nishioka Y., Leder A. and Leder, P. (1980).** Unusual a-globin-like gene that has cleanly lost both globin intervening sequences. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, 77 (5): 2806-2809.
153. **Nobrega M. P., Nobrega F. G. and Tzagoloff A. (1990).** *COX10* codes for a protein homologous to the ORF1 product of *Paracoccus denitrificans* and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (24): 14220-14226.
154. **Nobrega M. P., Bandeira S. C. B., Beers J. and Tzagoloff A. (2002).** Characterization of *COX19*, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (43): 40206-40211.
155. **Nott A., Meislin S. H. and Moore, M. J. (2003).** A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA*, 9: 607–617.
156. **Nugent J. M. and Palmer J. D. (1991).** RNA-mediated transfer of the gene *COXII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell*, 66: 473-481.
157. **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.

-
158. **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: 233-339.
159. **Olaf M. and Knoop V. (1998).** Trans-splicing group II introns in plant mitochondria: The complete set of cis-arranged homologs in ferns, fern allies, and a hornwort RNA. 4: 1599–1609.
160. **Ooms G., Hooykaas P. J., Van Veen R. J., Van Beelen P., Regensburg-Tuink T. J. and Schilperoort R. A. (1982).** Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid*, 7 (1): 15-29.
161. **Orphanides G. and Reinberg D. (2002).** A unified theory of gene expresión. *Cell*, 108: 439–51.
162. **Oshima R. G., Abrams L. and Kulesh D. (1990).** Activation of an intron enhancer within the *keratin 18* gene by expression of c-fos and c-lun in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells. *Genes and Development*, 4: 835-848.
163. **Palacios, I. M. (2002).** RNA processing: splicing and the cytoplasmic localisation of mRNA. *Current Biology*, 12: 50–52.
164. **Palacios I. M. D., Gatfield, St. Johnston D. and Izaurralde E. (2004).** An eIF4AIII containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, 427: 753–757.
165. **Palena C. M., Gonzalez D. H, Guelman S. and Chan R. L. (1998).** Expression of sunflower homeodomain containing proteins in *Escherichia coli*: purification and functional studies. *Protein Expression and Purification*, 13: 97-103.
166. **Park N. I. and Muench D. G. (2007).** Biochemical and cellular characterization of the plant ortholog of PYM, a protein that interacts with the exon junction complex core proteins Mago and Y14. *Planta*, 225: 625–639.

-
167. **Park N., Yeung E. C., Muench D. G. (2009).** Mago Nashi is involved in meristem organization, pollen formation, and seed development in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 176: 461–469.
168. **Pendle A. F., Clark G. P., Boon R., Lewandowska D., Lam Y. W., Andersen J., Mann A. I., Lamond, J. W, Brown, and Shaw P. J. (2005).** Proteomic analysis of the *Arabidopsis* nucleolus suggests novel nucleolar functions. *Molecular Biology of Cell*, 16: 260–269.
169. **Petracek M. E., Nuygen T., Thompson W. F., Dickey L. F. (2000).** Premature termination codons destabilize *ferredoxin-1* mRNA when ferredoxin-1 is translated. *Plant Journal*, 21: 563–569.
170. **Pfanner N. and Geissler A. (2001).** Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2 (5): 339-349.
171. **Plesse B., Criqui M. C., Durr A., Parmentier Y., Fleck J. and Genschik P. (2001).** Effects of the polyubiquitin gene *Ubi.U4* leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 45: 655–667.
172. **Poirer Y., Nawrath C. and Somerville C. (1995).** Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnology*, 13: 142-150.
173. **Poyton R. O., Duhl D. M. J. and Clarkson G. H. D. (1992).** Protein export from the mitochondrial matrix. *Trends in Cellular Biology*, 2: 369-375.
174. **Poyton R. O. and McEwen J. E. (1996).** Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annual Review of Biochemistry*, 65: 563-607.
175. **Pring D., Brennicke A. and Schuster W. (1993).** RNA editing gives a new meaning to genetic information in mitochondria and chloroplasts. *Plant Molecular Biology*, 21: 1163-1170.
176. **Quetier F., Lejeune B., Delorme S. and Falconet D. (1985).** Molecular Organization and expresión of the mitochondrial genome of higher plants. In

- Encyclopaedia of Plant Fisiology 18. R. Douce and D.A. Day, Eds. Berlin: Springer-Verlag: 25-36.
177. **Reed R. (2003).** Coupling transcription, splicing and mRNA export. *Current Opinion in Cell Biology*, 15: 326–31.
178. **Ribichich K. F.; Tioni M. F.; Chan R. L. and Gonzalez D. H. (2001).** Cell-type-specific expression of plant *cytochrome c* mRNA in developing flowers and roots. *Plant Physiology*, 125: 1603-1610.
179. **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.
180. **Rodrigues J. P., Rode M., Gatfield D., Blencowe B. J., Carmo-Fonseca M. and Izaurralde E. (2001).** REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, 98 (3): 1030–1035.
181. **Rogers H. J., Bate N., Combe J., Sullivan J., Sweetman J., Swan C., Lonsdale D. M. and Twell D. (2001).** Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*. *Plant Molecular Biology*, 45: 577–585.
182. **Rose A. B. and Last R. L. (1997).** Introns act post-transcriptionally to increase expression of the *Arabidopsis thaliana* tryptophan pathway gene *PAT1*. *The Plant Journal*, 11(3): 455-464.
183. **Rose A. B. and Beliakoff J. A. (2000).** Intron-Mediated Enhancement of Gene Expression Independent of Unique Intron Sequences and Splicing. *Plant Physiology*, 122: 535–542.
184. **Rose A. B. (2002).** Requirements for intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis*. *RNA*, 8: 1444–1453.

-
185. **Rose A. B. (2004).** The effect of intron location on intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 40: 744–751.
186. **Rose A. B., Elfersi T., Parra G. and Korf I. (2008).** Promoter-proximal introns in *Arabidopsis thaliana* are enriched in dispersed signals that elevate gene expression. *Plant Cell*, 20: 543-551.
187. **Sahara S., Aoto M., Eguchi Y., Imamoto N., Yoneda Y. and Tsujimoto, Y. (1999).** Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*, 401: 168–173.
188. **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 and Genetic Systems*, 76 (2): 89-97.
189. **Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis T. (1989).** *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
190. **Schmidt B., McCracken J. and Ferguson-Miller S. (2003).** A discrete water exit pathway in the membrane protein cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Science. U.S.A.*, 100: 15539-15542.
191. **Schultz J. R., Tansey T., Gremke L., Storti R. V. (1991).** A muscle-specific intron enhancer required for rescue of indirect flight muscle and jump muscle function regulates *Drosophila tropomyosin I* gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 11: 1901-1911.
192. **Schuster W., Knoop, V., Grohmann L. and Brennicke A. (1993).** The mitochondrial genome on its way to the nucleus: different stages of genes transfer in plants. *FEBS Letters*, 325: 140-144.
193. **Schuster W. and Brennicke A. (1994).** THE PLANT MITOCHONDRIAL GENOME: Physical structure, information content, RNA editing, and gene

- migration to the nucleus. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 61-78.
194. **Schwerk C., Prasad J., Degenhardt K., Erdjument-Bromage H., White E., Tempst P., Kidd V. J., Manley J. L., Lahti J. M. and Reinberg D. (2003).** ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 23: 2981–2990.
195. **Sedmak J. and Grossberg S. (1977).** A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G-250. *Analytical Biochemistry*, 79: 544-552.
196. **Sessa G., Morelli G. and Ruberti I. (1993).** The Athb-1 and HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO Journal*, 12: 3507-3517.
197. **Shi H. and Xu R. (2003).** Crystal structure of the *Drosophila* Mago nashi–Y14 Complex. *Genes and Development*, 17: 971–976.
198. **Shibuya T., Tange T. O., Sonenberg N. and Moore, M. J. (2004).** eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11: 346–351.
199. **Sijmons P. C., Dekker B. M. M., Schrammeijer B., Verwoerd T. C., Van den Elzen P. J. M. and Hoekema A. (1990).** Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology*, 8: 217-221.
200. **Silve S., Rhode P. R., Coll B., Campbell J., Poyton R. O. (1992).** ABF1 is a phosphoprotein and plays a role in carbon source control of *COX6* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*: 4197-208.
201. **Silver J., Limjoco T. and Feinstone S. (1995).** Site-specific mutagenesis using the polymerase chain reaction. En: *PCR Strategies*. Innis M. A.; Gelfand, D. H.; Snisky, J. J. Academic Press, San Diego: 179-188.
202. **Sjöling S. and Glaser E. (1998).** Mitochondrial targeting peptides in plants. *Trends in Plant Science*, 3(4): 136-140.

-
203. **Smith D. B. and Johnson K. S. (1988).** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67: 31-40.
204. **Smits P. H., de Haan M., Maat C. and Grivell L. A. (1994).** The complete sequence of a 33 kb fragment on the right arm of chromosome II from *Saccharomyces cerevisiae* reveals 16 open reading frames, including ten new open reading frames, five previously identified genes and a homologue of the *SCO1* gene. *Yeast*, 10: 75-80. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14: 1173–1179.
205. **Swidzinski J., Zaplachinski S., Chuong S. D. X. and Wong, D. G. (2001).** Muench, Molecular characterization and expression analysis of a highly conserved rice Mago Nashi homolog. *Genome*, 44: 394–400.
206. **Taanman J. W. and Capaldi R. A. (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. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (25): 18754-18761.
207. **Taiz L. and Zeiger E. (2006).** *Plant Physiology*, Fourth Edition. Respiration and Lipid Metabolism. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachussets.
208. **Tange T., Shibuya T., Jurica M. S. (2005).** Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA*, 11: 1869-1883.
209. **Taylor N. L., Rudhe C., Hulett J. M., Lithgow T., Glaser E., Daya D. A. (2003).** Environmental stresses inhibit and stimulate different protein import pathways in plant mitochondria. *FEBS Letters* 547: 125–130.
210. **Toroser D., Plaut Z. and Huber S. (2000).** Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiology*, 123: 403–411.

-
211. **Trémousaygue D., Garnier L., Bardet C., Dabos P., Hervé C., Lescure B. (2003).** Internal telomeric repeats and “TCP-domain” protein binding sites cooperate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant Journal*, 33: 957-966.
212. **Twell D., Wing R., Yamaguchi J. and McCormick S. (1989).** Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 217 (2-3): 240-245.
213. **Twell D., Yamaguchi J., Wing R., 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 and Development*, 5 (3): 496-507.
214. **Umbach A. L. and Siedow J. N. (1993).** Covalent and Noncovalent Dimers of the Cyanide-Resistant Alternative Oxidase Protein in Higher Plant Mitochondria and Their Relationship to Enzyme Activity. *Plant Physiology*, 103: 845-854.
215. **Unsel M., Marienfeld J. R., Brandt P. and Brennicke A. (1997).** The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366.924 nucleotides. *Nature Genetics*, 15: 57-61.
216. **Van Eeden F. J., Palacios I. M., Petronczki M., Weston M. J. and St Johnston, D. (2001).** Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole. *Journal of Cellular Biology*, 154: 511–523.
217. **van Hoof A., Green P. J. (1996).** Premature nonsense codons decrease the stability of phytohemagglutinin mRNA in a position-dependent manner. *Plant Journal*, 10: 415–424.
218. **Voelker T. A., Moreno J. and Chrispeels M. J. (1990).** Expression analysis of a pseudogene in transgenic tobacco: a frameshift mutation prevents mRNA accumulation. *Plant Cell*, 2: 255–261.

219. **Wagner A. M. and Moore A. L. (1997).** Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defense mechanism. *Bioscience Reports*, 17: 319-333.
220. **Welchen E., Chan R. L. and Gonzalez, D. H. (2002).** Metabolic regulation of genes encoding cytochrome c and cytochrome c oxidase subunit Vb in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment*, 25: 1605-1615.
221. **Welchen E., Chan R. L., Gonzalez D. H. (2004).** The promoter of the *Arabidopsis* nuclear gene *COX5b-1*, encoding subunit 5b of the mitochondrial cytochrome c oxidase, directs tissue-specific expression by a combination of positive and negative regulatory elements. *Journal of Experimental Botany*, 55 (405): 1997-2004.
222. **Welchen E. and Gonzalez D. H. (2005).** Differential expression of the *Arabidopsis* cytochrome c genes *Cytc-1* and *Cytc-2*. Evidence for the involvement of TCP-domain protein-binding elements in anther- and *meristem*-specific expression of the *Cytc-1* gene. *Plant Physiology*, 139: 88-100.
223. **Welchen E. and Gonzalez D. H. (2006).** Overrepresentation of elements recognized by TCP-domain transcription factors in the upstream regions of nuclear genes encoding components of the mitochondrial oxidative phosphorylation machinery. *Plant Physiology*, 141: 540-545.
224. **Welchen E., Viola I. L., Jin K. H., Prendes L. P., Comelli R. N., Chan H.; Gonzalez D. H. (2009).** A segment containing a G-box and an ACGT motif confers differential expression characteristics and responses to the *Arabidopsis* *Cytc-2* gene, encoding an isoform of cytochrome c. *Journal of experimental botany*, 60 (3): 829-45.
225. **Wiedemann N., Truscott K. N., Pfannschmidt S., Guiard B., Meisinger C. and Pfanner N. (2004).** Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 18188-18194.

226. **Wiegand H. L., Lu S., and Cullen B. R. (2003).** Exon junction complexes mediate the enhancing effect of splicing on mRNA expresión. Proceedings of the National Academy of Science. USA, 100 (20): 11327–11332.
227. **Wright R. M, Simpson S. L. and Lanoil B. D. (1995).** Oxygen regulation of cytochrome c oxidase subunit VI gene, *COX6*, in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Research Communications: 676-685.
228. **Xu Y., Yu H., and May T. C. (1994).** Rice *Triosephosphate Isomerase* Gene 5' Sequence Directs β -Glucuronidase Activity in Transgenic Tobacco but Requires an Intron for Expression in Rice'. Plant Physiology, 106: 459-467.
229. **Yamamoto Y. Y., Tsuji H. and Obokata J. (1995).** 5'- Leader of a Photosystem I Gene in *Nicotiana sylvestris*, *psaDb*, contains a Translational Enhancer. The Journal of Biological Chemistry, 270 (21): 12466-12470.
230. **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 Journal, 15: 49-59.
231. **Zhang Y., Iratni R., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Reinberg, D. (1997).** Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. Cell, 89: 357–364.